



**POPULATIONSGENETISCHE UNTERSUCHUNG
AN DEM PKD 1 GEN DER KATZE IM HINBLICK
AUF DAS POLYZYSTISCHE SYNDROM**

SIMONE HELMIG

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

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

1. Auflage 2005

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

1st Edition 2005

© 2005 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, WETTENBERG
Printed in Germany



VVB LAUFERSWEILER VERLAG
édition scientifique

GLEIBERGER WEG 4, D-35435 WETTENBERG
Tel: 06406-4413 Fax: 06406-72757
Email: VVB-IPS@T-ONLINE.DE

www.doktorverlag.de

Aus dem Institut für Veterinärpathologie
- Fachgebiet Veterinärmedizinische Genetik und Zytogenetik -
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. A. Herzog

**Populationsgenetische Untersuchung
an dem PKD 1 Gen der Katze im
Hinblick auf das Polyzystische Syndrom**

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

Eingereicht von

Simone Helmig

Tierärztin aus Gießen

Gießen 2004

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

Dekan: Prof. Dr. Manfred Reinacher

Gutachter: Prof. Dr. Reto Neiger
PD Dr. Gerhard Schuler

Tag der mündlichen Prüfung: 27./28.4.2005

Meinen Eltern

Verzeichnis der Abkürzungen.....	9
1 EINLEITUNG.....	11
2 LITERATUR	13
2.1 Polyzystische Nierenerkrankung beim Menschen.....	13
2.1.1 Die Formen der polyzystischen Nierenerkrankung.....	13
2.1.2 Die ADPKD Gene.....	15
2.1.3 Mutationen der Gene PKD1 und PKD2.....	18
2.1.4 Die Produkte der Gene PKD1 und PKD2.....	19
2.1.5 Das Two-Hit Modell.....	22
2.1.6 Pathogenese der humanen ADPKD.....	25
2.1.7 Klinik.....	30
2.1.8 Diagnose.....	32
2.1.9 Therapie.....	33
2.2 Das Polyzystische Syndrom der Katze	34
2.2.1 Allgemein.....	34
2.2.2 Ätiologie.....	34
2.2.3 Vorkommen.....	36
2.2.4 Klinische Nierenbefunde.....	39
2.2.5 Symptome.....	41
2.2.6 Pathologisch-anatomische Nierenbefunde.....	42
2.2.7 Diagnose.....	42
2.2.8 Differentialdiagnose.....	44
2.2.9 Therapie.....	45
2.3 Chromosomale Lokalisation des PKD Gens bei der Katze (Felis catus).....	46
3 MATERIAL.....	49
3.1 Probenmaterial	49
3.2 Chemikalien	50
3.2.1 Verwendete Chemikalien.....	50
3.2.2 Spezielle Chemikalien und Kits.....	51
3.2.2.1 Polymerase-Ketten-Reaktion.....	51
3.2.2.2 Klonierung.....	52
3.3 Geräte und Laborbedarf.....	52
3.3.1 Geräte und Gebrauchsgegenstände.....	52

3.3.2	Verbrauchsmaterialien	53
3.4	Auswertungs-Software	53
3.5	Lösungen und Puffer	53
4	METHODEN	56
4.1	DNS Isolierung aus Blutproben mittels Aussalzmethode.....	56
4.1.1	Prinzip.....	56
4.1.2	Durchführung.....	56
4.2	Polymerasekettenreaktion (PCR).....	57
4.2.1	Prinzip.....	57
4.2.2	Taq Polymerase.....	60
4.2.3	Desoxynukleosidtriphosphate (dNTPs)	60
4.2.4	Puffer	61
4.2.5	MgCl ₂	61
4.2.6	Hemmstoffe und Beschleuniger.....	61
4.2.7	DNS Matrize	61
4.2.8	Primer	62
4.3	Radioaktive Markierung	65
4.3.1	Prinzip.....	65
4.3.2	Durchführung.....	65
4.4	Mikrosatelliten	66
4.5	Elektrophorese von Nukleinsäuren	67
4.5.1	Prinzip.....	67
4.5.2	Agarosegelelektrophorese.....	67
4.5.3	Polyacrylamidgelelektrophorese.....	68
4.5.4	Abschätzung der DNS Konzentration.....	69
4.5.5	Isolierung und Reinigung von DNS Fragmenten aus Agarosegelen.....	69
4.6	Analyse der Amplikons mit Restriktionsendonucleasen	70
4.6.1	Prinzip.....	70
4.6.2	Durchführung.....	70
4.7	DNS Klonierung	71
4.7.1	Prinzip.....	71
4.7.1.1	Herstellung eines rekombinierten DNS Moleküls	71
4.7.1.2	Transformation	72
4.7.1.3	Vervielfältigung.....	73

4.7.1.4	Selektion und Isolation des entsprechenden Klones.....	73
4.7.2	Durchführung.....	73
5	ERGEBNISSE.....	76
5.1	Beschreibung der Stichprobe.....	76
5.2	Der Vererbungsmodus des Polyzystischen Syndroms.....	80
5.2.1	Hypothese 1: Der Vererbungsmodus für PKD ist autosomal rezessiv.....	80
5.2.2	Hypothese 2: der Vererbungsmodus für PKD ist autosomal dominant.....	85
5.2.3	Hypothese 3: der Vererbungsmodus für PKD ist autosomal dominant und Homozygotie für das Krankheitsgen ist letal.....	88
5.3	Sequenzanalyse und intragenische Polymorphismen.....	92
5.3.1	Sequenz des PKD1 Gens der Katze im Bereich des Introns 41 und flankierender Exonanteile ...	92
5.3.2	Restriktionsschnittstellenpolymorphismus (RSP).....	98
5.3.3	Der Polymorphismus RSP4.....	99
5.3.4	Der Polymorphismus RSP2.....	100
5.3.4.1	Genotyp- und Allelfrequenzen für den Polymorphismus RSP2.....	102
5.3.4.2	Die Berechnung der Heterozygotie.....	103
5.3.4.3	Test auf Hardy-Weinberg-Gleichgewicht.....	103
5.4	Polymorphismus am Markerlokus FCA 476.....	105
5.4.1	Der Markerlokus FCA 476.....	106
5.4.1.1	Die Berechnung der Allel- und Genotypfrequenzen.....	112
5.4.1.2	Berechnung der Heterozygotie.....	114
5.4.1.3	Test auf Hardy-Weinberg-Gleichgewicht.....	114
5.4.1.4	Der Markerlokus FCA 476 und das Polyzystische Syndrom.....	115
5.5	Assoziationsstudie für die Marker RSP2 und FCA 476 mit dem Polyzystischen Syndrom.....	116
5.6	Kopplung des Polyzystischen Syndroms mit dem Markerlokus FCA 476.....	125
6	DISKUSSION.....	142
6.1	Beschreibung der Stichprobe.....	142
6.3	Der Vererbungsmodus des Polyzystischen Syndroms.....	144
6.4	Die Frage nach der Existenz von homozygoten Krankheitsträgern.....	145
6.5	Sequenzanalyse und intragenische Polymorphismen.....	146

6.6	Polymorphismus am Markerloкус FCA 476	148
6.7	Assoziationsstudie für die Marker RSP2 und FCA 476 mit dem Polyzystischen Syndrom	149
6.8	Kopplungsanalyse mittels LOD Score	150
6.9	Schlußfolgerung und Ausblick	152
6.10	Neuste Erkenntnisse und kürzlich veröffentlichte Ergebnisse zu PKD	154
7.	ZUSAMMENFASSUNG	157
8.	SUMMARY	159
9.	LITERATURVERZEICHNIS	160
10.	ANHANG.....	171
10.1	Tabellenanhang	171
10.2	PCR Programme	175

Verzeichnis der Abkürzungen

%	Prozent
% (vol/vol)	Volumenprozent
% (wt/vol)	Gewichtsprozent
$^{32}\text{P}\gamma\text{-ATP}$	$^{32}\text{P}\gamma\text{-Adenosintriphospat}$
AA/BAA	Acrylamid/Bisacrylamid
A	Adenin
Abb.	Abbildung
ad	autosomal dominant
ADPKD	Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease (humane Form)
AMP	Adenosinmonophosphat
ar	autosomal rezessiv
ARPKD	Autosomal Rezessiv Polycystic Kidney Disease (humane Form)
AS	Aminosäure
APS	Ammoniumpersulfat
aqua bidest.	aqua bidestillata
ATP	Adenosintriphospat
bp	Basenpaare
C	Cytosin
cAMP	zyklo AMP
CFTR	cystic fibrosis transmembrane conductance regulator
cDNA	complementär DNA
cM	centiMorgan
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
HG	homologes Gen
kb	Kilobasen
LOD	Logarithmus der Wahrscheinlichkeit (logarithm of the odds)

LOH	loss of heterozygosity
MHz	Megahertz
mRNA	messenger RNA
p	kurzer Arm eines Chromosoms
P2Y2	purinerner Rezeptor
PCR	Polymerase Ketten Reaktion
pH	negativer dekadischer Logarithmus der H ⁺ -Konzentration
PKD	Polyzystisches Syndrom (feline Form)
PKD Gen	Gen der polyzystischen Nierenerkrankung (polycystic kidney disease gene)
q	langer Arm eines Chromosoms
RFLP	Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus
RNA	Ribonukleinsäure
SDS	Natrium-Dodecylsulfat
Taq	Thermus aquaticus
TE	Tris/HCl/EDTA Puffer
TBE	Tris-Acetat/EDTA Puffer
TEMED	Tetramethyldiamin
Tris	Tris-hydroxymethylaminomethan
TSC2	Tuberous-Sclerosis-Complex 2
TSC2 Gen	Tuberous-Sclerosis-Complex Gene2
US	Ultraschalluntersuchung

1 Einleitung

Die autosomal dominante polyzystische Nierenerkrankung (ADPKD) ist in der Humanmedizin eine seit langem bekannte Erbkrankheit.

In der Tiermedizin und speziell bei der Katze liegen vereinzelte Berichte jedoch erst seit 1967 vor (Battershell und Garcia, 1998). Aufgrund der großen Ähnlichkeit mit der humanen Form der Erkrankung erlangte das Polyzystische Syndrom bei der Katze (PKD) in den letzten Jahren ein immer größer werdendes Interesse. Möglicherweise kann das Polyzystische Syndrom der Katze als Modell der humanen ADPKD verwendet werden und so der weiteren Erforschung und dem Verständnis der molekularbiologischen Abläufe sowie der Entwicklung von Therapiemöglichkeiten dienen. Mit dem zunehmenden Wissen über PKD bei der Katze steigt aber auch die züchterische Verantwortung des Menschen gegenüber dem Tier als Mitgeschöpf.

Bei einem autosomalen Erbgang muss man davon ausgehen, dass bei der Paarung eines PKD positiven Tieres mit einem PKD negativen Tier 50% der Nachkommen (F1-Generation) den genetischen Defekt erben. Auch wenn nicht alle Tiere innerhalb ihrer Lebensspanne erkranken, so handelt es sich doch um einen dominanten Erbgang. Auf diesem Weg kann ein Tier unerkannt in die Zucht gelangen, ohne selbst Symptome zu zeigen und zur Verbreitung der Erkrankung beitragen.

Laut Tierschutzgesetz (§11b) ist es verboten, mit erbkranken Tieren zu züchten, wenn es dabei zu Schmerzen und Leiden kommt.

Jeder Züchter ist deshalb verpflichtet, seine Zuchttiere untersuchen zu lassen und falls notwendig aus der Zucht zu nehmen. PKD könnte innerhalb kürzester Zeit wieder an Bedeutung verlieren, sobald es möglich ist, den Defekt genetisch sicher nachzuweisen und PKD positive Tiere von der Zucht auszuschließen.

Zur Zeit basiert die Diagnose auf Ultraschalluntersuchungen, die frühestens bei 8 Wochen alten Katzen durchgeführt werden können. Selbst bei einer Untersuchung von 10 Monate alten Tieren kann die Erkrankung bei dieser Untersuchungsmethode unerkannt bleiben. Falsch negative Untersuchungsergebnisse sind möglich und können zum Fortbestand der Krankheit führen.

Dieser Umstand gab Anlaß zu den vorliegenden molekulargenetischen Untersuchungen, deren Ziel es ist die Diagnose sicher zu gestalten.

Von der Entwicklung eines sicheren Testverfahrens hängt es ab, ob sich das Polyzystische Syndrom (PKD) züchterisch eliminieren läßt.

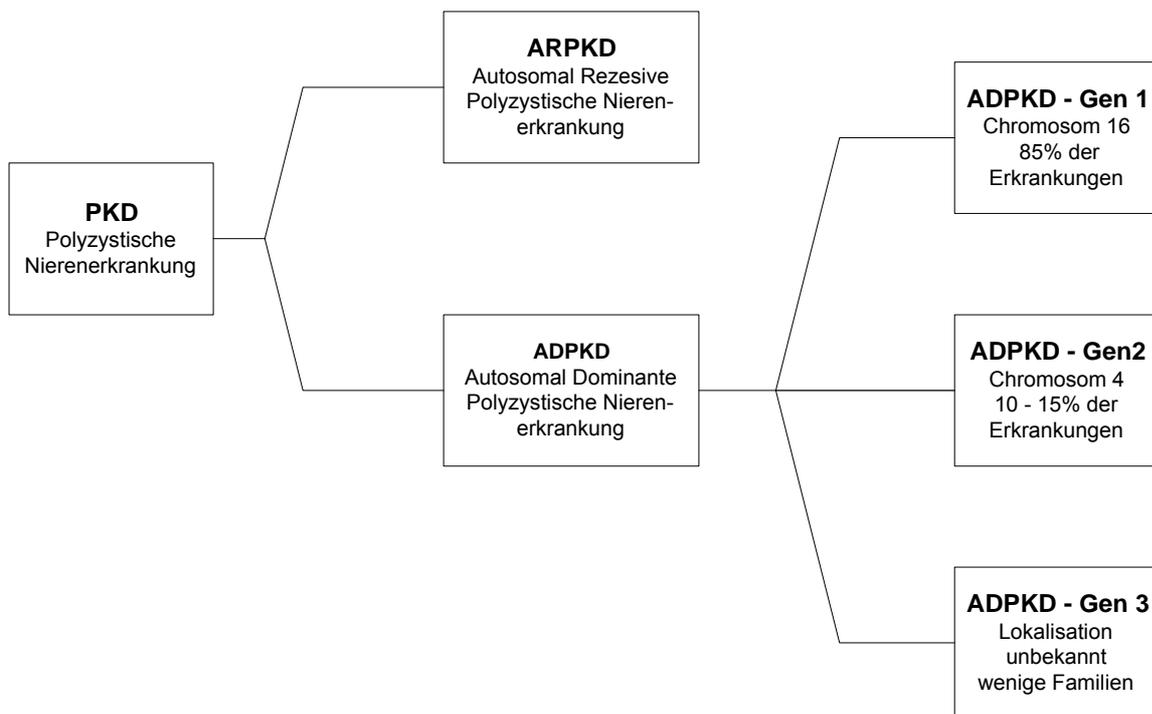
2 Literatur

2.1 Polyzystische Nierenerkrankung beim Menschen

2.1.1 Die Formen der polyzystischen Nierenerkrankung

Grundsätzlich unterscheidet man bei den erblichen polyzystischen Nierenerkrankungen des Menschen zwischen zwei Formen:

Abb.1: Erbliche polyzystische Nierenerkrankungen beim Menschen



Schematische Darstellung der erblichen polyzystischen Nierenerkrankungen. Beim Menschen ist eine autosomal rezessive Form (ARPKD) und eine autosomal dominante Form (ADPKD) bekannt. Für die autosomal dominante polyzystische Nierenerkrankung des Menschen kommen ursächlich drei verschiedene Gene in Frage (PKD1, PKD2, PKD3).

2.1.1.1 Die Autosomal Rezessive Polyzystische Nierenerkrankung (ARPKD)

Mit einer Inzidenz von 1:10000 bis 1:40000 (Cole et al., 1987) ist diese rezessive Form viel seltener anzutreffen als die dominante Form.

Der Genlocus für ARPKD liegt auf dem humanen Chromosom 6 (Murcia et al., 1998). Diese Erkrankung verläuft sehr dramatisch und führt oft schon in der neonatalen Periode zum Tod. Gezeichnet von der stark progressiven Bildung von Nierenzysten kommt es bei Homozygoten spätestens kurz nach der Geburt bzw. in den ersten Lebensmonaten zu Nierenversagen. Leberfibrose ist sehr häufig zu beobachten, während Zysten ausschließlich in den Nieren vorkommen. Nur sehr selten kommen bei ARPKD auch jugendliche Formen vor (Grantham et al., 1993).

2.1.1.2 Die Autosomal Dominante Polyzystische Nierenerkrankung (ADPKD)

Die autosomal dominante polyzystische Nierenerkrankung ist eine der häufigsten Erbkrankheiten des Menschen. Sie betrifft eine von 1000 Personen in der Bevölkerung und macht ca. 8-10% der Dialysepatienten aus (Gabow et al., 1993).

ADPKD zeichnet sich durch eine unterschiedliche Anzahl von mit Flüssigkeit gefüllten Zysten in beiden Nieren aus, die mit zunehmenden Alter größer werden und langsam das ursprüngliche Nierengewebe verdrängen. Dies führt zu Nierenversagen, welches beim Erreichen des 50. Lebensjahres die Hälfte der Patienten betrifft (Gabow et al., 1992).

Auch eine Reihe extrarenaler Manifestationen sind mit ADPKD assoziiert. Diese beinhalten Leberzysten, Zysten in Pankreas und Milz, Leberfibrose, Herzklappendefekte (Mitralis), Aorta und cerebrale Aneurysmen sowie Darmdivertikel, insbesondere Colondivertikel (Gabow et al., 1990).

Erste Krankheitssymptome zeigen sich in der Regel im Alter von 30-40 Jahren, wobei hier eine große Variationsbreite vorliegt. Sogar innerhalb einer Familie können einige Mitglieder sehr früh sterben, während andere erst viel später Symptome entwickeln (Shokeir et al., 1978). Frauen erreichen im Durchschnitt das Stadium des chronischen Nierenversagens sechs Jahre später als Männer (Gretz et al., 1989).

Eines der ersten Symptome ist der Bluthochdruck, welcher bei 75% der betroffenen Personen noch vor einer Nierendysfunktion auftritt (Hansson et al., 1974). Das

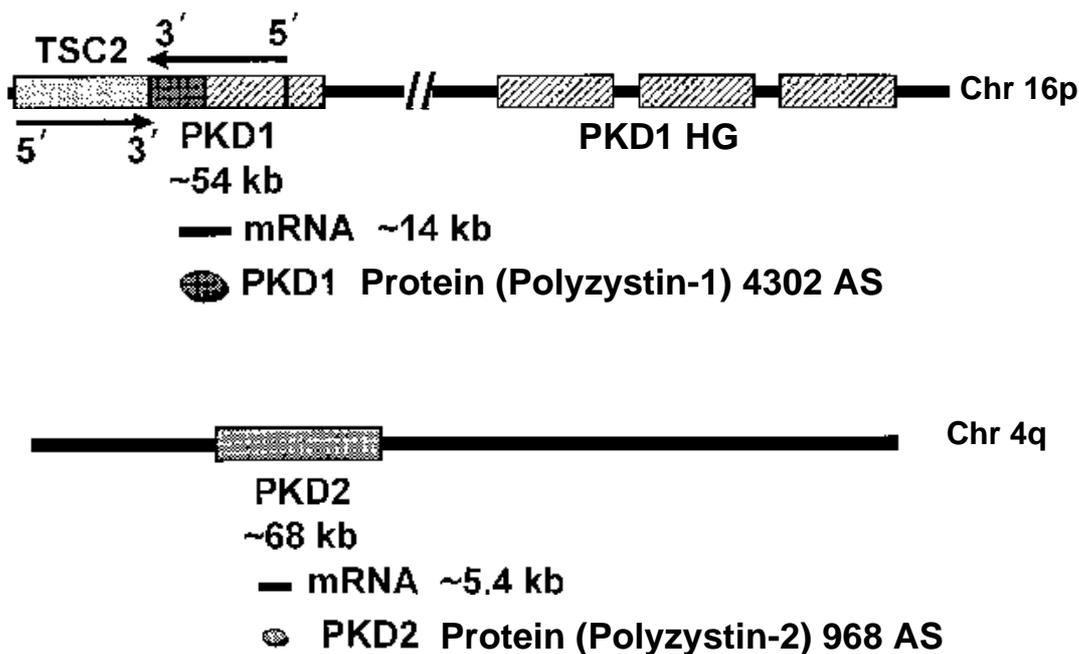
Renin-Angiotensin System ist bei Patienten mit Bluthochdruck aktiviert. Eine erhöhte Reninfreisetzung ist wahrscheinlich die Folge von wachsenden Zysten, welche intrarenale Ischämien verursachen (Chapman et al., 1990).

2.1.2 Die ADPKD Gene

ADPKD ist genetisch heterogen. Die phänotypisch nicht zu unterscheidende Erkrankung wird durch Mutation in einem der 3 verantwortlichen Gene hervorgerufen.

Das PKD1 Gen ist für ca. 85% der Fälle (Peters und Sandkuijl, 1992), das PKD2 Gen für ca. 10% - 15% der Fälle verantwortlich und nur bei wenigen Familien gibt es Hinweise auf das PKD3 Gen (Sessa et al., 1997).

Abb.2: Die PKD1 und PKD2 Genstruktur



Das PKD1 Gen liegt mit einer Länge von ~54 kb auf dem humanen Chromosom 16. Die mRNA dieses Gens hat eine Länge von ~14 kb und das hieraus resultierende Protein, Polyzystin 1, besteht aus 4302 Aminosäuren (AS). Mit HG bezeichnet sind die homologen Gene, die eine 95%ige Sequenzähnlichkeit mit 60% des 5' Endes vom PKD1 Gen aufweisen. Direkt angrenzend an das PKD1 Gen liegt Ende an Ende das TSC2 Gen (*Tuberous-Sclerosis-Complex Gene2*). Das PKD2 Gen liegt mit einer Länge von ~68 kb auf dem humanen Chromosom 4. Die mRNA dieses Gens hat eine Länge von ~5,4 kb und das hieraus resultierende Protein, Polyzystin 2, besteht aus 968 Aminosäuren (AS).

(Quelle: Calvet, 1998)

2.1.2.1 Das ADPKD1 Gen

PKD1 liegt auf dem kurzen Arm von Chromosom 16 an der Stelle 16p 13.3 und ist auf 46 Exons verteilt. Das Gen beinhaltet 54 kb genomischer DNA, sein Transkript ungefähr 14,136 kb. Das daraus abgeleitete Protein Polyzystin 1, enthält 4302 Aminosäuren (European Polycystic Kidney Disease Consortium, 1994; Burn et al., 1995; Hughes et al., 1995; International Polycystic Kidney Disease Consortium, 1995). Das PKD1 Gen befindet sich in einer sehr genreichen Region, in direkter Nachbarschaft des TSC2 Gens (Koptides et al., 2000).

Die Struktur des Gens erschwert die Suche nach Mutationen. Zwei Drittel der genomischen Sequenz vom 5' Ende des PKD1 Gens, ungefähr 50.000 Basenpaare (einschließlich Exons und Introns) werden mehrere Male an der Stelle 16p13.1 mit einer Sequenzähnlichkeit von >95% wiederholt. Diese sogenannten homologen Gene (HG-A ~ 21 kb, HG-B ~ 17 kb, HG-C ~ 8.5 kb) sind transkriptionell aktiv, jedoch ist noch nicht bekannt, ob funktionelle Proteine produziert werden (European Polycystic Kidney Disease Consortium, 1994). Diese beim Menschen vorhandenen Wiederholungen, die die Exons 1 bis 33 beinhalten, kommen nicht bei Nagetieren vor (Olsson et al., 1996) und auch beim Hund wurde das PKD1 Gen kürzlich als *single-copy* Gen beschrieben (Dackowski et al., 2002). Das humane PKD1 Gen besitzt zwei lange Polypyrimidin Sequenzen in Intron 21 und 22. Die im Intron 21 liegende Polypyrimidin Sequenz ist mit 2,5 kb die längste im humanen Genom beschriebene Sequenz (American PKD1 Consortium, 1995).

Im Gegensatz hierzu fehlt dem Hund eine solche Polypirimidin Sequenz, jedoch konnten Wiederholungssequenzen im caninen Intron 30 detektiert werden (Dackowski et al., 2002). Das PKD1 Gen der Maus befindet sich auf dem Chromosom 17 und auch hier fehlt die Polypyrimidin Sequenz in den Introns 21 und 22 (Piontek et al., 1999). Vermutlich neigen lange Polypyrimidin Sequenzen zur Bildung einer Triple Helix Formation, welche eine Prädisposition zum Auftreten von Mutationen darstellt (Mirkin et al., 1994; Wang et al., 1996). Angrenzend an das 3' Ende des PKD1 Genes liegt das 3' Ende des TSC2 Genes (*Tuberous-Sclerosis-Complex Gene2*) (European Polycystic Kidney Disease Consortium, 1994). Bei ca. 30% aller TSC2 Patienten treten Nierenzysten auf (Cook et al., 1996) und

Mutationsanalysen ergaben, dass es sich in ~2-3% um Deletionen handelt, die auch Teile des PKD1 Genes betreffen (Wu et al., 2000).

2.1.2.2 Das ADPKD2 Gen

Das PKD2 Gen liegt auf dem langen Arm von Chromosom 4 bei 4q21-q23. Das Gen umfaßt 68 kb und sein Transkript 5,4 kb, dessen Translationsprodukt Polyzystin 2 aus 968 Aminosäuren besteht (Mochizuki et al., 1996; Schneider et al., 1996).

Das PKD2 Gen enthält 15 Exons und besitzt im Gegensatz zum PKD1 Gen keine Polypyrimidin Sequenz. Das erste Exon des PKD2 Gens ist sehr GC reich, wodurch die Mutationswahrscheinlichkeit erhöht wird. PKD2 liegt als *single-copy* Gen vor (Koptides et al., 2000).

ADPKD verläuft bei Personen mit einer Mutation im PKD2 Gen wesentlich weniger aggressiv. Gemessen an den Serumkreatininwerten erreichen PKD1 Probanden einen Wert von 1.5 mg/dl (130µmol/L) im Durchschnitt mit 49 Jahren, während PKD2 Probanden in der Regel nicht vor Erreichen eines Alters von 70 Jahren einen erhöhten Wert aufweisen (Gabow et al., 1992). Das durchschnittliche Alter beim Erreichen der terminalen Niereninsuffizienz liegt in PKD1 Familien bei ca. 56 Jahren, hingegen in PKD2 Familien bei ca. 71,5 Jahren (Ravine et al., 1992).

Das Maus Homolog zu dem humanen PKD2 Gen wurde dem Chromosom 5 zugeordnet (Wu et al., 1997).

2.1.2.3 Das ADPKD3 Gen

PKD3, ein weiteres Gen, das vermutlich für die Erkrankung bei wenigen Familien verantwortlich sein soll, konnte noch keinem bestimmten Chromosom zugeordnet werden (Daoust et al., 1995; Turco et al., 1996).

2.1.3 Mutationen der Gene PKD1 und PKD2

Mindestens 56 verschiedene Mutationen im PKD1 Gen sind identifiziert worden, wie im Internationalen PKD Gen Mutations Register (Internet: PKD Foundation, www.pkdcure.org/profess2.htm) angegeben wird. Mit einigen wenigen Ausnahmen weist jede untersuchte Familie eine eigene Mutation auf (Rossetti et al., 1996; Neophytou et al., 1996; Turco et al., 1996; Roelfsema et al., 1996; Pearl et al., 1996; Turco et al., 1995; Pearl et al., 1995).

Zwei Drittel der beschriebenen Mutationen liegen in der *single-copy* Region des PKD1 Gens und inaktivieren dieses. Sie sind Resultate von *nonsense* Mutationen, *missense* Mutationen oder Rasterverschiebungen (Frameshifts), wie *splicing* Defekten oder Deletionen und führen zum vorzeitigen Abbruch bei der Translation.

Bei den PKD2 Gen Mutationen von vier untersuchten Familien handelte es sich in drei Fällen um *nonsense* Mutationen (Mochizuki et al., 1996) und in einem Fall um eine Rasterverschiebung (Xennophontos et al., 1997).

Zur Zeit sind 45 Mutationen im PKD2 Gen identifiziert, wobei es sich um einfache Basenaustausche oder Insertionen, Deletionen von wenigen Basenpaaren sowie Rasterverschiebungen (Frameshifts) handelt (Wu et al., 2000).

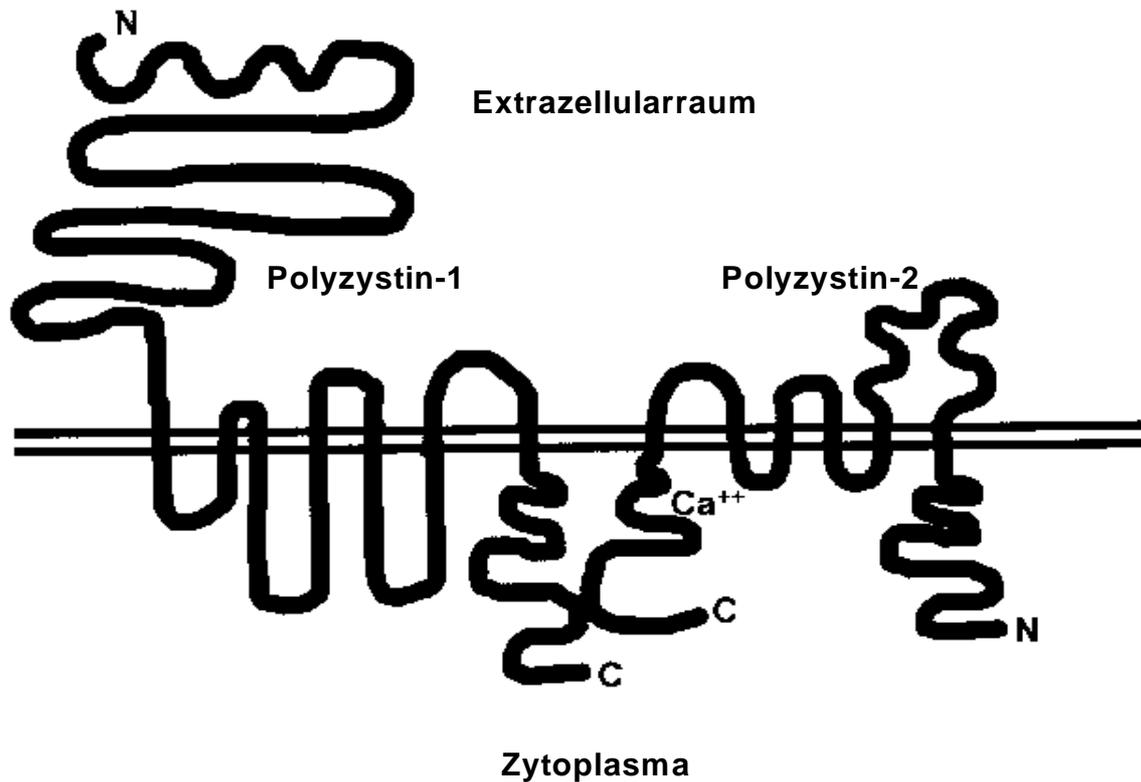
Zwei neuere Studien enthalten Beweise für den Verlust der Heterozygotie (LOH, *loss of heterozygosity*) in den die Zysten begrenzenden Epithelzellen (Quian et al., 1996; Brasier et al., 1997). Zusätzlich zu der ursprünglichen Mutation (dem geerbten Defekt) geht das nicht mutierte Chromosom (bzw. die Region) wahllos in einigen Zellen während der Nierenentwicklung oder später in der voll entwickelten Niere verloren, so dass nur das mutierte Allel zurückbleibt. Dies würde auch die Tatsache erklären, dass sich nur aus weniger als 1% der Nephrone Zysten entwickeln (Quian et al., 1996).

Diese Hypothese des sogenannten "*two-hit-Mechanismus*" besagt, dass eine somatische Mutation unerlässlich für die Entstehung der Zysten ist. Allerdings würde dies eine ungewöhnlich hohe Mutationsrate voraussetzen. Eine mögliche Erklärung

hierfür ist, dass eine sehr lange (2.5 kb) Polypyrimidinsequenz im Intron 21 das PKD1 Gen und dessen Umgebung überaus instabil macht (Quian et al., 1996).

2.1.4 Die Produkte der Gene PKD1 und PKD2

Abb.3: Die PKD1 und PKD2 Proteine



Polyzystin 1 beinhaltet insgesamt 4302 Aminosäuren. Sein extrazellulär gelegener N-Terminus ist mit über 3000 Aminosäuren sehr lang. Die transmembranen Anteile bestehen aus 1000 Aminosäuren und sein zytoplastisch gelegener C-Terminus interagiert mit dem C-Terminus des Polyzystin 2. Polyzystin 2, mit einer Länge von 968 Aminosäuren, besitzt sechs transmembranale Segmente und sowohl sein N-Terminus wie auch sein C-Terminus liegen intrazellulär.

Quelle: Calvet, (1998)

2.1.4.1 Das Protein Polyzystin 1

Polyzystin 1 ist ein sehr langes membranassoziertes Glycoprotein, dessen strukturelle Merkmale mit denen von Rezeptoren übereinstimmen. Das N-Terminus mit einer Länge von über 3.000 Aminosäuren liegt extrazellulär. Die transmembrane Region mit 1.000 Aminosäuren besitzt intra- und extrazelluläre Anteile und das C-

Terminus mit ~250 Aminosäuren liegt im Zytosol (The European Polycystic disease Consortium, 1994; Burn et al., 1995; The International Polycystic disease Consortium, 1995; Hughes et al., 1995; Harris et al., 1995).

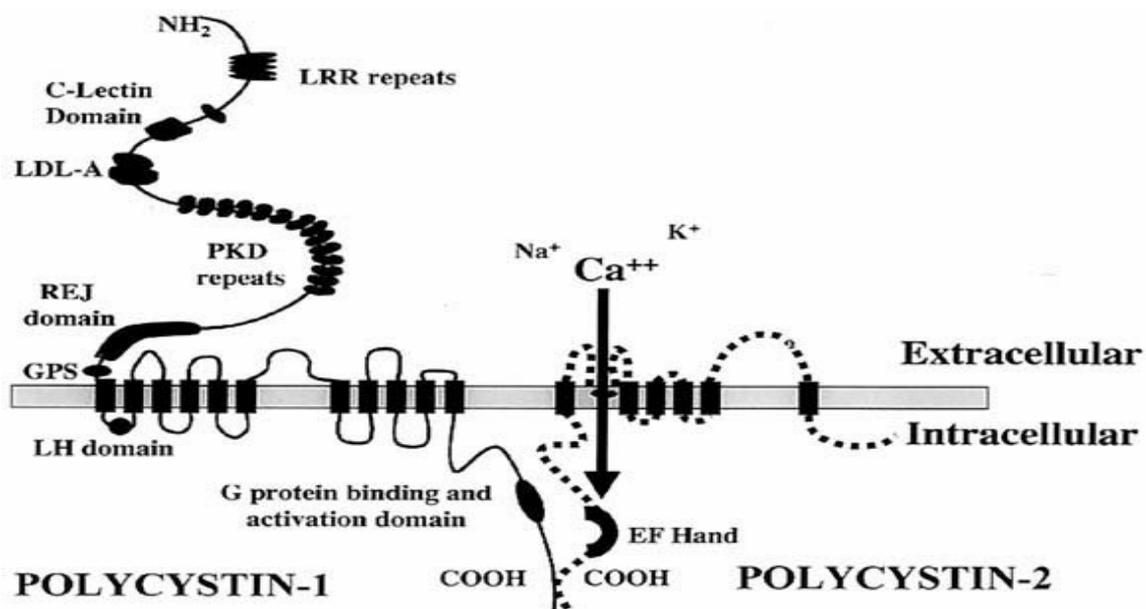
Das extrazelluläre NH₂-Terminus beinhaltet zwei leucinreiche Repeats (LRR), die von zwei zysteinreichen Domänen und einer C-Typ Lectin Domäne flankiert werden. Zudem beinhaltet das Terminus eine LDL-A-ähnliche Domäne, 16 Kopien von einem 80 - 90 Aminosäure Repeat, den sogenannten Immunoglobulin-ähnlichen Motiven sowie einer 1000 Aminosäure langen Region mit einer hohen Ähnlichkeit zu dem Spermienrezeptor des Seeigels (*sea urchin sperm receptor for egg jelly*) (Harris et al., 1995; Moy et al., 1996). Bei diesem Rezeptor handelt es sich um ein extrazelluläres, membranverankertes Protein, welches an der Akrosomenreaktion beteiligt ist (Koptides und Deltas, 2000). Darauf folgen elf transmembrane Regionen, an die sich der zytoplasmatisch liegende COOH-Terminus anschließt, welcher mehrere mögliche Phosphorylierungsstellen beinhaltet. Es wurde demonstriert, dass dieser Bereich die Aktivierung von AP1, einem bei Zellproliferation, Differenzierung und Apoptose beteiligten Transkriptionsfaktor, auslöst (Arnould et al., 1998). Weiterhin stabilisiert es endogenes β -Catenin und stimuliert TCF-abhängige Gentransskription in humanen embryonalen Nierenzellen (Kim et al., 1999). Eine 74 Aminosäure lange Region des Proteins bindet und aktiviert zudem heterotrimeres G-Protein (Parnell et al., 1998; Calvet et al., 2000). Alle diese Studien weisen darauf hin, dass Polyzystin 1 eine bedeutende Rolle in den Signalkaskaden der Zelle, bei der Proliferationskontrolle und bei der Differenzierung spielt. Aufgrund seiner Struktur wird vermutet, dass Polyzystin 1 als Rezeptor mit einer Zell-Zell oder Zell-Matrix Interaktion fungiert.

2.1.4.2 Das Protein Polyzystin 2

Polyzystin 2 besitzt sechs transmembranale Segmente. Sein N-Terminus und sein C-Terminus liegen intrazellulär (Mochizuki et al., 1996). Eine Sequenzähnlichkeit mit Polyzystin 1 und der Familie der Kalziumkanäle (spannungsabhängige Kalziumkanäle) liegt vor. Zusätzlich besitzt es eine kalziumbindende Region (*calcium binding EF-hand*).

Kürzliche Untersuchungen ergaben, dass die C-Termini von Polyzystin 1 und 2 interagieren (Quian et al., 1991; Tsiokas et al., 1997). Es wird vermutet, dass Polyzystin 2 als Kalziumkanal fungiert und durch Polyzystin 1 reguliert wird (Mochizuki et al., 1996). Sehr wahrscheinlich handelt es sich hierbei um einen Kationenkanal mit einer bevorzugten Leitfähigkeit für Kalzium (Sutter et al., 2003).

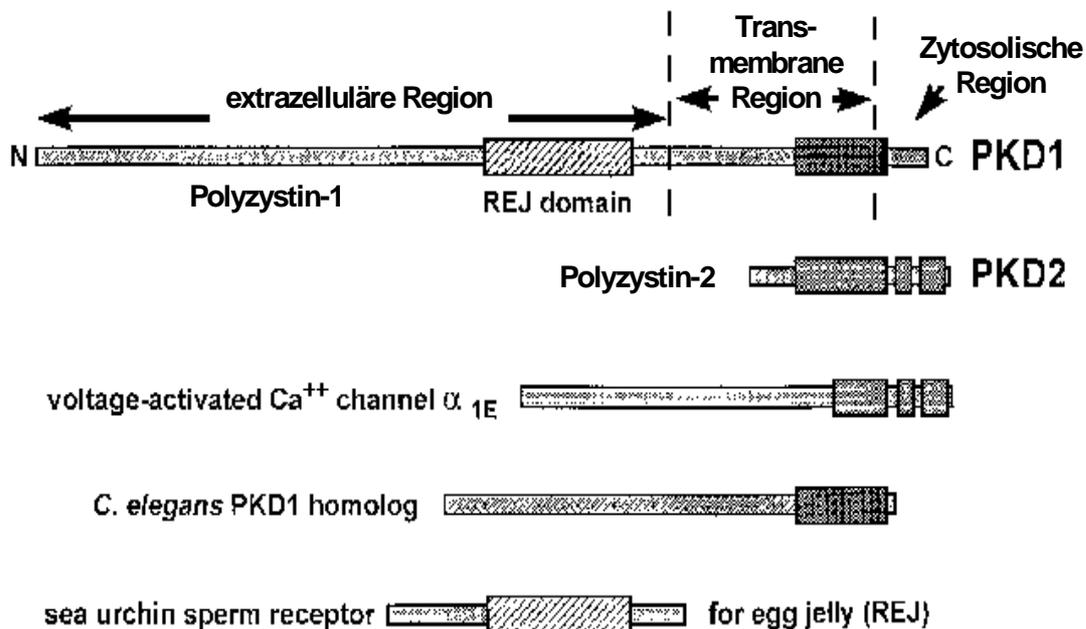
Abb.4: Die einzelnen Regionen von Polyzystin 1 und Polyzystin 2



Diese Abbildung zeigt die Lage der zwei Proteine Polyzystin 1 und Polyzystin 2 zueinander und die Lage ihrer funktionellen Einheiten. Die einzelnen Regionen der Proteine sind mit ihrer englischen Bezeichnung benannt. Für nähere Erklärung siehe Text.

Quelle: Sutter und Germino, (2003)

Abb.5: Homologe Proteine zu Polyzystin 1 und Polyzystin 2



In den oberen zwei Reihen sind die Proteine Polyzystin 1 und Polyzystin 2 mit ihren N-Termini (N) links und ihren C-Termini (C) rechts dargestellt. Die sehr große extrazelluläre Region des Polyzystin 1 besitzt homologe Anteile zu dem Spermienrezeptor des Seeigels (REJ). Eine Region in der Nähe des C-Terminus des Polyzystin 1 besitzt homologe Anteile zu Polyzystin 2, dem spannungsabhängigen Kalziumkanal und dem C. elegans Protein (PKD1 Homolog). Polyzystin 2 besitzt zwei weitere mit dem Kalziumkanalprotein homologe Regionen, die etwas weiter in Richtung C-Terminus liegen.
 Quelle: Sutter und Germino, (2003)

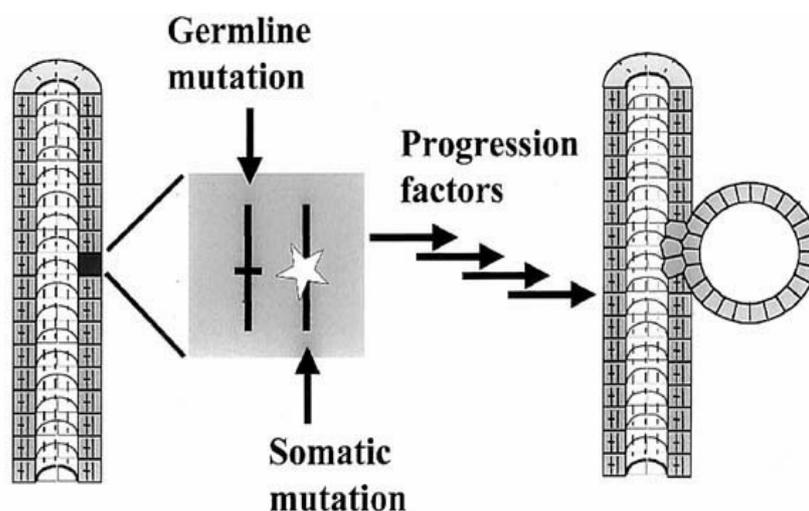
2.1.5 Das Two-Hit Modell

Die phänotypische Heterogenität von ADPKD manifestiert sich vor allem in der großen intra- und interfamiliären Varianz des Alters, in dem die Patienten erkranken. Weiterhin entstehen Nierenzysten nur aus 1-5% der Nephrone, obwohl alle Zellen die vererbte Mutation tragen (Quia und Germino, 1997; Koptides et al., 1998, 1999). Dies wirft die Frage auf, warum, wenn alle Nierenzellen eines Individuums die gleiche geerbte Mutation tragen, nur ein Teil dieser Fraktion Zysten bildet. Einige Erklärungsversuche sind bisher getätigt worden, doch deuten die neuerlich gewonnenen Erkenntnisse auf das Two-Hit Modell hin (Wu und Somlo, 2000). Dieses Modell erklärt, dass ein Individuum zunächst eine Mutation (*first hit*) in einem der Allele erbt und während seines Lebens eine weitere Mutation (*second hit*) erwirbt, welche das *wild-typ* Allel des gleichen Gens betrifft (Koptides und Deltas,

2000). Diese Inaktivierung könnte aufgrund einer vollständigen Deletion des *wild-typ* Allels, durch einen Mechanismus den man als *loss of heterozygosity* (LOH) kennt hervorgerufen werden. Oder sie könnte durch eine Punktmutation innerhalb des Gens ausgelöst werden (Koptides und Deltas, 2000). Bei einem Anteil von 15%-24% der untersuchten Zysten wurde *loss of heterozygosity* (LOH) oder eine somatische Mutation nachgewiesen und zudem wurde dargestellt, dass hiervon das ursprünglich gesunde Allel betroffen war. Quian und Mitarbeiter (1996) untersuchte monoklonale Zelllinien, die aus Zystenepithelzellen gewonnen wurden und demonstrierte *loss of heterozygosity* (LOH) in bis zu 20% der Nierenzysten.

Diese Ergebnisse konnten von Brassier und Mitarbeiter (1997) sowie Koptides und Mitarbeiter (1998) bestätigt werden. Zudem wurde eine inaktivierende somatische Mutation bei 40% der untersuchten Leberzysten ermittelt (Watnick et al., 1998).

Abb.6: Schematische Darstellung des Two-Hit Modells



Das *Two-Hit* Modell erklärt die Entstehung von Zysten bei einem Individuum, welches bereits eine Mutation (*Germline mutation*) in einem Allel des PKD Gens besitzt. Durch eine weitere somatische Mutation (*Somatic mutation*), die im Laufe des Lebens entsteht und welche das *wild-typ* Allel des gleichen Gens betrifft, kommt es zur Zystenbildung (*Progression factors*).

Quelle: Sutter und Germino, (2003)

Verschiedene Tiermodelle wurden für ADPKD entwickelt und geben Einblick in die molekulare Pathogenese dieser Erkrankung (Sutter und Germino, 2003). Für PKD1 wurde ein Mausmodell entwickelt, bei dem eine Deletion des Exon 34 vorliegt.

Homozygote ($PKD1^{del34/del34}$) Mäuse sterben in utero mit massiven Veränderungen der Nieren, Pankreas und Lunge, während heterozygote ($PKD1^{+/del34}$) Tiere im Alter

von 9-14 Monaten Nieren- und Leberzysten entwickeln. Bei einigen dieser fehlt Polyzystin 1 (Lu et al., 1997, 1999).

Bei einem weiteren Mausmodell, mit einer Insertionsmutation des Exon 4 kam es bei Homozygoten (PKD1^{ins4 / ins4}) zum embryonalen Tod, wobei hier zusätzlich massive Gewebswassersucht und Polyhydramnion festgestellt werden konnte (Lu et al., 1998).

Das Mausmodell WS25 mit einer Insertionsmutation wurde entwickelt, um Exon 1 des PKD2 Gens zu unterbrechen, woraus sich ein instabiles Allel ergab. Bei den hieraus resultierenden Nachkommen konnte das Wildtyp Polyzystin 2 Allel nachgewiesen werden, obwohl es sich um Tiere handelte, die homozygot für WS25 waren. Erwartungsgemäß sollten jedoch beide PKD2 Allele unterbrochen sein.

In diesem Modell fanden zwei verschiedene intragenetische Rekombinationsvorgänge statt. Zum einen entstand ein wahres Nullallel und zum anderen eine Reversion zum Wildtypallel, bei dem das Konstrukt in das an Exon 1 angrenzende Intron plaziert wurde. Die rekombinierten Allele waren anschließend relativ stabil. Der Zeitpunkt des stattfindenden Rearrangements war somit ausschlaggebend für die Anzahl der betroffenen Zellen, in denen PKD2 in ein Null- oder Wildtypallel konvertiert wurde. Bei Tieren, bei denen die Rekombination direkt nach der Fertilisation stattfand, waren alle Zellen betroffen. Mosaikmäuse hingegen hatten eine variable Menge an Polyzystin 2. Embryonaler Tod konnte bei diesen Tieren nicht beobachtet werden. Die Tiere überlebten bis ins Erwachsenenalter und entwickelten polyzystische Nieren. WS25 und wahre Nullallele wurden so kombiniert, dass ein Modell PKD2^{WS25 / -} für die LOH Theorie entstand. Diese Tiere besitzen ein geerbte Nullmutation und ein instabiles WS25 Allel, welches einer somatischen Mutation während der Entwicklung oder im Erwachsenenalter unterliegen kann. Diese Mäuse entwickelten eine zystische Erkrankung der Nieren, der Leber und des Pankreas mit klinischen Manifestationen die der humanen ADPKD vergleichbar sind (Wu et al., 1998, 2000)

Die Erkenntnisse aus diesem Mausmodell, zusammen mit den Studien über den "loss of heterozygosity" Mechanismus, führen zu der Beschreibung von ADPKD als eine zellulär rezessive Erkrankung. "Zellulär Rezessiv" wird in diesem

Zusammenhang verwendet, um die Entstehung von zwei inaktiven Allelen durch einen Mechanismus zu beschreiben, der von dem klassischen rezessiven Modell abweicht. Dies besteht darin, dass ein Allel eine Keimbahnmutation trägt, welche für sich allein nicht ausreichend ist, um die Erkrankung hervorzurufen (daher rezessiv) und eine zweite neue Mutation auf dem anderen Allel in einer individuellen Zelle entsteht (daher zellulär).

2.1.6 Pathogenese der humanen ADPKD

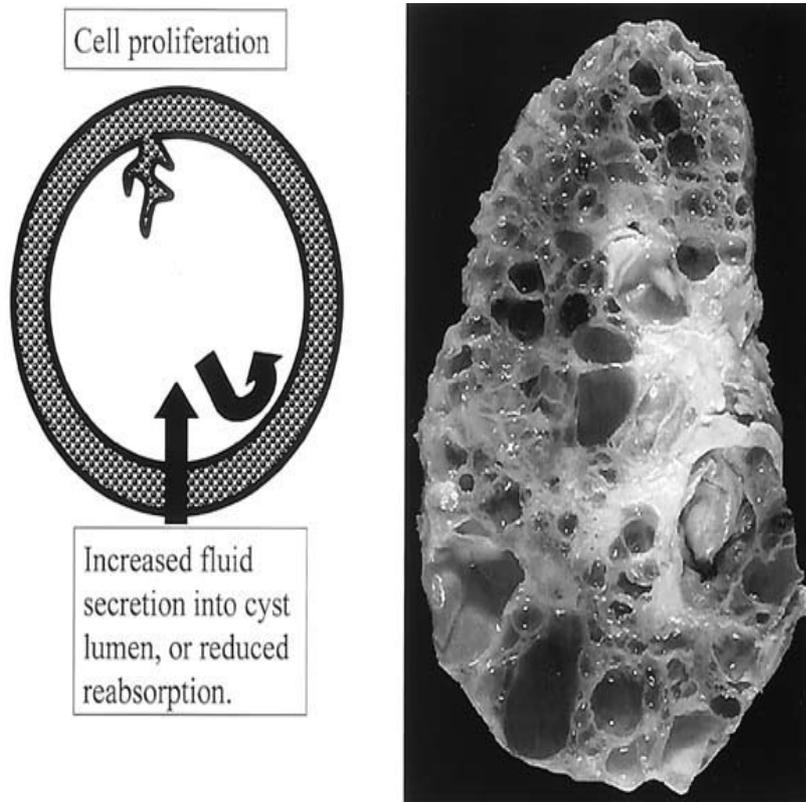
Die Pathogenese von ADPKD schließt eine erhöhte Zellproliferation und einen abnormen Differenzierungsstatus ein. Die Nieren von ADPKD Patienten können größer als 12 cm und schwerer als 6 kg werden. Sie sind mit flüssigkeitsgefüllten Zysten unterschiedlicher Größe, deren Anzahl von fünf bis mehrere hundert betragen kann, durchsetzt. Im fortgeschrittenen Stadium der Erkrankung zeigt sich eine interstitielle Fibrose, sicherlich sekundär bedingt durch die Ischämie und / oder die gehäuft vorkommenden Entzündungen der Nieren (Sessa et al., 1997).

Die Zysten haben ihren Ursprung in allen Anteilen der Nephrone, vom Glomerulum bis hin zu den Sammelgängen und wachsen zunehmend in ihrer Größe und Anzahl. Die Größenzunahme ist bedingt durch Flüssigkeitsansammlung im Lumen, jedoch besteht bei Zysten, die größer als 200 μm sind, keine Verbindung mehr zu den Nierenkanälchen (Gardner et al., 1994).

Abnormale Epithellzellproliferation, abnormale intrazystöse Flüssigkeitsansammlung und abnormale extrazelluläre Matrix der tubulären Basalmembran, welche die Zysten umgibt, spielen eine Rolle in der Pathogenese der Nierenzysten (Grantham, 1993; Wilson et al., 1991; Woo et al., 1994).

Vermutlich regulieren die Gene PKD1 und PKD2 durch ihre Proteine die Differenzierung und Morphogenese des Epithels, deren Inaktivierung entsprechende Konsequenzen zur Folge hätte. Eine ähnliche Pathogenese wäre auch für andere zystische Erkrankungen der Niere vorstellbar (Calvet, 1998).

Abb.7: Die Entstehung von Nierenzysten



Für die Entstehung und Größenzunahme der Zysten muß sich die Zahl der Zellen innerhalb der Zystenwand erhöhen und Flüssigkeit muß sich im Zystenlumen ansammeln bedingt durch eine erhöhte Sekretion, eines verminderten Abflusses oder einer Kombination aus beidem. Erhöhte Zellteilung in der Zystenwand ist oft mit der Bildung von Polypen, die in das Zystenlumen hineinragen, vergesellschaftet. Das Resultat dieser Prozesse ist eindrucksvoll in dem Bild (rechts) der Zystenniere dargestellt.

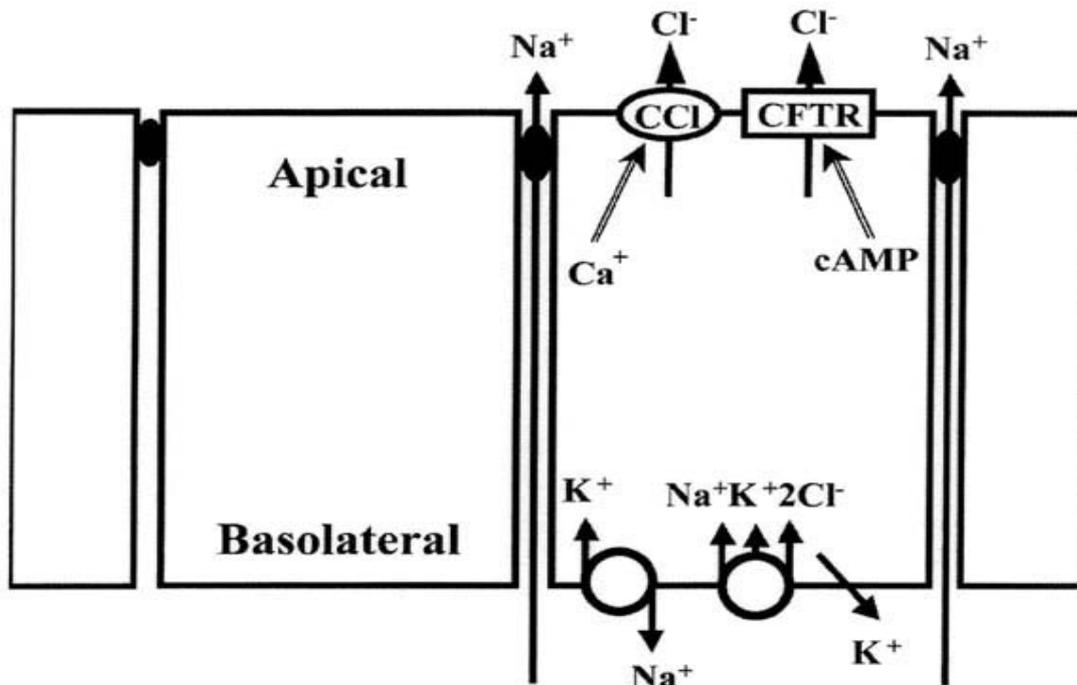
Quelle: Sutter und Germino, (2003)

Für die Entstehung und Größenzunahme der Zysten muß sich die Zahl der Zellen innerhalb der Zystenwand erhöhen und Flüssigkeit muß sich im Zystenlumen ansammeln, bedingt durch eine erhöhte Sekretion eines verminderten Abflusses oder einer Kombination aus beidem.

Die meisten Studien, die den Mechanismus der transepithelialen Flüssigkeitssekretion untersucht haben, benutzten zu diesem Zweck die Rektaldrüse des Haies oder Kolon bzw. respiratorisches Epithel (Greger, 1996; Barrett et al., 2000). In diesen Studien konnte demonstriert werden, dass die Flüssigkeitssekretion in Abhängigkeit zu der sekundär aktiven Chloridionensekretion steht. Diese wiederum wird über die Stimulation des CFTR (*cystic fibrosis transmembrane conductance*

regulator) oder über einen kalziumabhängigen Chloridkanal, beide in der apikalen Zellmembran lokalisiert, vermittelt.

Abb.8: Die transepitheliale Chloridsekretion



Die Aktivierung der apikalen Chloridkanäle wird vermutlich über die Erhöhung der intrazellulären Kalzium- oder cAMP Konzentration gesteuert. Durch die Aktivität der Na/K ATPase wird ein negatives intrazelluläres Potential hervorgerufen, welches zum Chloridionenaustritt über die apikale Membran führt. Dieses negative Potential kommt durch den Kaliumionenaustritt, über Kaliumkanäle in beiden Membranen zustande. Diese Kaliumkanäle sind auch für das Recycling des Kaliums in Hinblick auf den Na-K-2Cl-Cotransporters wichtig. Eine niedrige intrazelluläre Chloridionenkonzentration führt dann vermutlich durch den Na-K-2Cl-Cotransporter zum Chloridioneneintritt über die basolaterale Membran. Der sekundär aktive Transport von Chloridionen wird von einem parazellulären Natriumionenaustrom begleitet.

Quelle: Sutter und Germino, (2003)

An der Chloridsekretion beteiligte Abläufe sind die Aktivierung der apikalen Chloridkanäle durch eine erhöhte intrazelluläre Konzentration von Kalzium oder cAMP und der passive Transport von Chlorid durch die apikale Membran, hervorgerufen durch eine Erhöhung des intrazellulären negativen Potentials aufgrund der Na-K-ATPase-Aktivität.

Der Chloridioneneinstrom erfolgt an der basolateralen Membran möglicherweise durch den Na-K-2Cl-Cotransporter, welcher von einer niedrigen intrazellulären Chloridionenkonzentration aktiviert wird. Das negative intrazelluläre Potential rührt vom Kaliumaustritt durch Kaliumkanäle in beiden Membranen her. Kaliumkanäle sind auch für das Recycling des Kaliums notwendig, welches von dem Na-K-2Cl-

Cotransporter für den Chloridionentransport verwendet wird. Der passive Transport von Chloridionen wird vom Natriumionenausstrom durch parazelluläre ionenselektive Kanäle begleitet (Sutter und Germino, 2003).

Die Beobachtung, dass Forskolin, welches die intrazelluläre cAMP Konzentration erhöht und CFTR aktiviert, Zystenepithel zur Flüssigkeitssekretion veranlasst, könnte die Flüssigkeitsansammlung in Zysten bei ADPKD erklären (Ye und Grantham, 1993). Zudem wurde CFTR im ADPKD Zystenepithel identifiziert (Davidow et al., 1996).

Eine alternative Erklärung ergibt sich aus der Beobachtung in einem Nagetiermodell für zystische Nierenerkrankung, bei dem die renale cAMP Produktion erhöht war (Yamaguchi et al., 1997), und aus der Beobachtung, dass die Zystenflüssigkeit einen Aktivator der Adenylatzyklase und der transepithelialen Flüssigkeitssekretion enthält (Ye und Grantham, 1993). Daher ist es möglich, dass CFTR vermittelte Chloridionensekretion bei ADPKD nicht durch abnormale Transportwege sondern durch eine pathologisch erhöhte Stimulation dieser Signalwege zustande kommt (Sutter und Germino, 2003).

In renalen Epithelzellen kann zudem die Aktivierung von kalziumabhängigen Chloridionenkanälen durch intrazelluläres Kalzium die Chloridionensekretion induzieren (Gandhi et al., 1998; Boese et al., 2000). Die Stimulation des purinergen Rezeptors P2Y2 durch extrazelluläres ATP ist ein potenter Stimulus für die Chloridionensekretion in vielen epithelialen Systemen unter anderem in den renalen Tubulusepithelzellen (Boese et al., 2000; Cuffe et al., 2000). Der Mediator hier ist Phospholipase C, welche die intrazelluläre Kalziumkonzentration erhöht (Viana et al., 1998) und den kalziumabhängigen Chloridionenkanal aktiviert (Boese et al., 2000). Der purinerge Signalweg ist in Bezug auf ADPKD interessant, weil Polyzystin eine zentrale Rolle in der Kalziumhomöostase spielt (Somlo und Ehrlich, 2001; Koulen et al., 2002). Andererseits ist aber auch denkbar, dass die Flüssigkeitssekretion bei ADPKD einfach die Konsequenz aus einer ATP Ansammlung innerhalb des Zystenlumens ist (Schwiebert et al., 2002).

Der Verlust der Polyzystinsignalkaskade könnte auf verschiedenen Wegen zu einer erhöhten transepithelialen Chloridionensekretion führen.

Einmal könnte eine Dedifferenzierung mit einer Chloridsekretion zusammenhängen. Verschiedene Beispiele existieren, die diese Hypothese unterstützen.

So ist die Chloridionensekretion ein fester Bestandteil bei der Entwicklung von epithelialen Systemen, auch wenn diese später der Resorption dienen (Huber et al., 2000; Broackes-Carter et al., 2002). In diesem Stadium dient die Sekretion möglicherweise der Erhaltung von Lumina in den sich entwickelnden Organen. Angeführt wurde dies am Beispiel von unausgereiften Kolonenterozyten, die zunächst Transporter zur Chloridionensekretion besitzen, welche im weiteren Verlauf der Entwicklung durch Transporter ersetzt werden, die Flüssigkeitsresorption vermitteln (Matthews et al., 1998). Diese phänotypische Veränderung ist unter anderem assoziiert mit der Herunterregulierung der kalziumaktivierten Chloridkanäle und des Na-K-2Cl-Cotransporters. Möglicherweise spielt die Dedifferenzierung des Zystenepithels bei ADPKD eine ähnliche Rolle (Sutter und Germino, 2003).

Zum anderen wird intrazelluläres cAMP und CFTR vermittelte Chloridionensekretion, eventuell von Polyzystin, durch die Aktivierung eines heterotrimeren G-Proteins, welches die Adenylatcyclase hemmt, herunter reguliert (Parnell et al., 1998; Kim et al., 1999; Delmas et al., 2002; Francken et al., 1998). Durch den Ausfall dieses Effektes würde es zu einer Erhöhung des cAMP und zu einer Hochregulation der Chloridionensekretion kommen (Sutter und Germino, 2003).

Außerdem ist denkbar, dass es in Anbetracht des Zusammenspiels von Polyzystin und der intrazellulären Kalziumhomöostase durch Veränderungen im Kalziumhaushalt der Zelle kurz- oder langfristig zu einer Erhöhung der Chloridionenkonzentration kommen kann (Sutter und Germino, 2003).

2.1.7 Klinik

Das Ausmaß sowie der Zeitpunkt des Auftretens klinischer Symptome variiert zwischen einzelnen Patienten, auch innerhalb von Angehörigen einer Familie. Mit zunehmender Vergrößerung der Nierenzysten werden auch die Symptome immer deutlicher. Ob und in welchem Ausmaß es zu extrarenalen Manifestationen mit entsprechender Symptomatik kommt, ist sehr unterschiedlich.

Folgende Komplikationen sind mit ADPKD vergesellschaftet (McCarthy und McMullen, 1997):

2.1.7.1 Hypertension / Bluthochdruck

Bluthochdruck entsteht durch eine Aktivierung des Renin-Angiotensin-Systems und ist eines der ersten Symptome in ADPKD Patienten. Durch die Vergrößerung der Zysten kommt es innerhalb der Nieren zu einer druckbedingten Ischämie und dadurch zur Freisetzung von Renin (Gabow et al., 1990). Renin wiederum baut das in der Leber synthetisierte inaktive Peptid Angiotensinogen zum Dekapeptid Angiotensin I ab.

Das Angiotensin-converting-Enzym katalysiert dessen Abbau zum Oktapeptid Angiotensin II, welches in der Nebennierenrinde die Aldosteronsynthese stimuliert. Vasokonstriktion sowie Wasser- und Natriumretention sind die Folgen, deren Resultat Bluthochdruck ist.

Bleibt dieser Zustand unbehandelt, kann es zur weiteren Beeinträchtigung der Nieren und zur Schädigung extrarenaler Organe kommen.

2.1.7.2 Schmerzen

Chronische oder akute Schmerzen in der Rücken- bzw. Flankenregion kommen sehr häufig vor. Die Intensität reicht von leichten bis hin zu kolikartigen Schmerzen.

Größere Zysten, aber auch Nephrolithiasis oder Entzündungen der Zysten, kommen hierfür als Ursache in Frage.

2.1.7.3 Nephrolitiasis und Entzündung der Harnorgane

Nephrolitiasis kommt mit einer Häufigkeit von 8% - 36% bei ADPKD Patienten vor (Torres et al., 1993). Strukturelle und metabolische Abnormalitäten, vor allem Harnstau in eingengten Kanälchen und eine verminderte Zitratrekretion, sind prädisponierende Faktoren für die Entstehung von Harnsteinen (Gabow, 1993).

Infektionen können die Zysten selbst oder das Nierenparenchym betreffen (Gabow, 1993). Es ist wichtig, wenn auch schwierig, zwischen beiden Formen zu unterscheiden, da nur wenige Antibiotika die Fähigkeit zur Penetration der Zysten besitzen. Zysteninfektionen sind in der Regel mit positiven Blutkulturen assoziiert, während eine Pyelonephritis Leukozytenzylinder aufweist.

2.1.7.4 Polyurie

Vermindertens Harnkonzentrierungsvermögen ist eine der ersten Beeinträchtigungen der Niere. Zu einem späteren Zeitpunkt können Proteinurie und Hämaturie hinzu kommen.

2.1.7.5 Extrarenale Zysten

Zysten können mit entsprechenden Symptomen in vielen anderen Organen vorkommen. Am häufigsten sind sie in der Leber zu beobachten, jedoch wird auch von Zysten in Pankreas, Milz, Uterus, Ovarien, Lunge und Gehirn berichtet (Gabow et al., 1997)

2.1.7.6 Kopfschmerzen

Kopfschmerz ist ein häufig anzutreffendes Symptom bei ADPKD Patienten. Ihre Ursache ist Bluthochdruck, in einigen Fällen auch zerebrale Aneurysmen.

Ca. 4-10% der ADPKD Patienten haben asymptomatisch intrakranielle Aneurysmen, wobei dieses Symptom familiär gehäuft vorkommt (Chauveau et al., 1994). Die Ruptur eines solchen Aneurysma ist eine gefürchtete Komplikation.

2.1.7.7 Kardiovaskuläre Manifestationen

Herzklappendefekte, insbesondere Mitral- und Trikuspidalprolaps (Lieske und Toback, 1993) und Aneurismen der Aorta abdominalis, der Aorta thoracii sowie der Koronararterien (Grantham, 1995) sind mit ADPKD vergesellschaftet.

2.1.7.8 Kolondivertikel

Kolondivertikel unklarer Pathogenese sind mit über 80% sehr häufig bei ADPKD Patienten. Die Ruptur eines solchen Divertikels stellt eine gefährliche Komplikation dar. Möglicherweise spielt hier die abnormale extrazelluläre Matrix eine Rolle (Gabow, 1993).

2.1.8 Diagnose

In ihrer voll entwickelten Form ist die Diagnose von ADPKD nicht schwierig. In diesem Stadium sind die polyzystischen Nieren beidseitig vergrößert und haben eine unregelmäßige Oberfläche.

Eine Diagnose zu einem früheren Zeitpunkt ist durch Ultraschall möglich. Um falsch positive bzw. falsch negative Ergebnisse zu minimieren, werden folgende Kriterien benutzt:

1. Patienten unter 30 Jahren - mindestens zwei Nierenzysten unilateral oder bilateral.
2. Patienten zwischen 30 und 59 Jahren - mindestens zwei Nierenzysten in jeder Niere.
3. Patienten 60 Jahre und älter - mindestens vier Nierenzysten in jeder Niere.

Zusätzliche Zysten in der Leber oder im Pankreas können zur Sicherung der Diagnose beitragen (Ravine et al., 1994).

Mit Hilfe von DNS Linkage Studien kann ADPKD in Patienten mit einer positiven Familiengeschichte auch schon intra uterin diagnostiziert werden (Welling und Grantham, 1996).

2.1.9 Therapie

Das therapeutische Ziel bei ADPKD Patienten ist, die Nierenfunktion aufrecht zu erhalten. Behandlung des Bluthochdrucks, sowie der Harntraktinfektionen sind dabei die wichtigsten Maßnahmen.

Bei beginnender Beeinträchtigung der Nierenfunktion kann eine proteinarme Diät den Verlauf der Erkrankung verlangsamen. Im Stadium der chronischen Niereninsuffizienz bleiben als einzige therapeutische Maßnahmen die Dialyse und die Nierentransplantation (McCarthy und McMullen, 1997).

2.2 Das Polyzystische Syndrom der Katze

2.2.1 Allgemein

Das Polyzystische Syndrom ist eine langsam fortschreitende, irreversible Nierenerkrankung, die zum Nierenversagen führt. Sie ist gekennzeichnet durch die Entwicklung und durch das Wachstum von Zysten in beiden Nieren.

Seit 1969 wird PKD bei der Katze sporadisch in der Literatur erwähnt (Battershell und Garcia, 1998).

Den ersten Hinweis auf die Erbllichkeit der Erkrankung liefern Crowell und Mitarbeiter (1979), jedoch begannen systematische Untersuchungen über das Polyzystische Syndrom erst etwa zehn Jahre später (Biller et al., 1998).

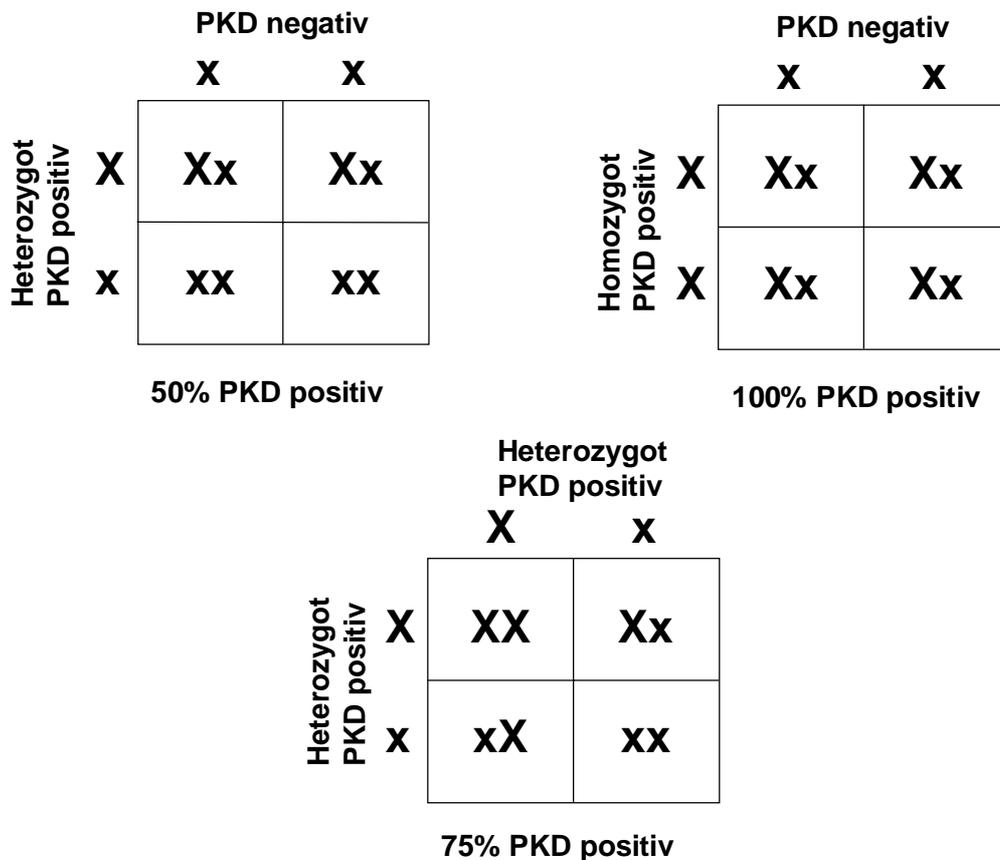
2.2.2 Ätiologie

In Zuchtstudien wiesen Biller und Mitarbeiter (1996) einen autosomal dominanten Erbgang nach. Hierbei wurden die Nachkommen einer 6 Jahre alten, PKD positiven Katze auf Nierenzysten mittels Ultraschall untersucht. Aus zwei Würfen dieser Katze mit einem PKD negativen Perserkater gingen 5 Jungtiere hervor. Von den 4 verfügbaren Jungtieren konnten 3 als PKD positiv identifiziert werden. Die zwei männlichen PKD positiven Nachkommen wurden mit nicht betroffenen, nicht verwandten PKD negativen Katzen gekreuzt. Per Ultraschall konnten PKD positive Tiere bereits im Alter von 7 Wochen erkannt werden, während die Abwesenheit von Zysten durch Ultraschall im Alter von 6 Monaten und Autopsie bestätigt wurde. Die Nachkommen der Paarung PKD positiv x PKD negativ ergaben 42% betroffene und 58% nichtbetroffene Tiere.

Bei der Paarung PKD positiv x PKD positiv waren 73% der Nachkommen PKD positiv und 27% PKD negativ. Diese Ergebnisse stimmen mit einem autosomal dominanten Vererbungsmodus überein.

Bei den untersuchten Tieren waren sowohl männliche als auch weibliche Tiere betroffen. PKD zeigt also keine Geschlechtsabhängigkeit.

Abb.9: Möglichkeiten der Vererbung bei PKD positiven Katzen



Bei einem autosomal dominanten Erbgang können PKD positive Tiere sowohl homozygot (XX) wie auch heterozygot (Xx) für den Krankheitsgenort sein. Bei der Paarung eines heterozygoten PKD positiven Tieres mit einem PKD negativen (xx) Tier würden erwartungsgemäß 50% der Nachkommen PKD positiv sein. Bei der Paarung eines homozygoten PKD positiven Tieres mit einem PKD negativen Tier würden entsprechend 100% der Nachkommen PKD positiv sein. Die Existenz von homozygoten Tieren ist beim Polyzystischen Syndrom jedoch fraglich. Bei der Paarung zweier heterozygoter PKD positiver Tiere würden erwartungsgemäß 75% der Nachkommen PKD positiv sein.

Quelle: CFA The Cat. Fanciers Association Health Committee [<http://www.cfainc.org/health/pkd.html>]

2.2.3 Vorkommen

Das Polyzystische Syndrom wird in der Literatur vorwiegend bei Perserkatzen beschrieben, kann aber auch bei anderen kurz- oder langhaarigen Katzen auftreten (Meyer-Lindberg et al., 1999).

Amerikanische Untersuchungen (Arlington, Texas) an 150 Katzen ergaben ein positives Ergebnis für annähernd 40% der Tiere von unterschiedlichen Zuchtlinien und Farben (CFA Health Committee, 1998).

Von 192 untersuchten Perserkatzen an der Tierärztlichen Hochschule Hannover wiesen 47 Tiere ($\cong 24,5\%$) multiple Zysten auf (Meyer-Lindberg et al., 1999).

Eine Tabelle, in der Untersuchungsergebnisse registriert werden können, befindet sich im Internet unter der Adresse: <http://www.indyweb.net/~lucky/Stats.html>.

Einen Überblick über die Häufigkeit PKD positiver Perserkatzen geben diese im Internet veröffentlichten Registrierungen (Tabelle 1). Hier werden Untersuchungsergebnisse auf PKD aus verschiedenen Ländern eingetragen. Deutlich wird der insgesamt sehr hohe Anteil an PKD positiven Perserkatzen, der sich über viele Länder erstreckt und auf verschiedenen Kontinenten annähernd gleiche Werte ergibt.

Tabelle 1: Im Internet registrierte PKD Untersuchungsergebnisse bei Perserkatzen

Land	Anzahl getestet	Anzahl positiv	% positiv
USA	5384	2099	39%
Australien	10	6	60%
Österreich	9	5	56%
Kanada	99	22	22%
Dänemark	27	5	19%
England (UK)	24	9	38%
Finnland	11	2	18%
Deutschland	153	16	9%
Italien	6	2	33%
Niederlande	67	14	21%
Neuseeland	15	10	67%
Norwegen	152	53	35%
Spanien	11	7	64%
Schweden	837	338	40%
Slovakei	24	8	33%
Südafrika	162	60	42%
Perserkatzen gesamt	6991	2656	38%

Die im Internet veröffentlichte Tabelle gibt die Untersuchungsergebnisse auf PKD bei der Perserkatze in verschiedenen Ländern wider. Je nach Anzahl der untersuchten Tiere sind die Ergebnisse mehr oder weniger repräsentativ für die einzelnen Länder. Deutlich wird jedoch der insgesamt sehr hohe Anteil an PKD positiven Perserkatzen.

Quelle: [Internet], PKD statistic summary page www.indyweb.net/~lucky/stats.html

Unter derselben Internetadresse ist eine weitere Tabelle (Tabelle 2) veröffentlicht, die der Registrierung von PKD positiven Untersuchungsergebnisse bei anderen Katzenrassen dient.

Das Polyzystische Syndrom betrifft somit auch andere Katzenrassen, wobei es sich in den meisten Fällen um perserverwandte Rassen handelt.

Tabelle 2: Im Internet registrierte PKD Untersuchungsergebnisse bei Nicht Perserkatzen

Rasse	Anzahl getestet	Anzahl positiv	% positive
Hauskatze	1	1	100%
Feral	1	1	100%
American Curl	1	1	100%
American Shorthair	21	9	42%
	3	3	100%
	7	3	43%
American Wirehair	3	0	
	2	1	50%
British Shorthair	20	0	
	8	3	38%
	14	0	
	4	2	50%
	1	0	
Domestic Shorthair	19	0	
	1	1	100%
Scottish Fold	14	2	14%
	12	5	42%
	46	14	30%
	6	0	0
Tonkanese	7	0	
Insgesamt	191	46	24%

Registrierung von PKD positiven Untersuchungsergebnisse bei Nicht Perserkatzenrassen. Insgesamt sind nur sehr wenige Tiere registriert, daher sind die Prozentzahlen sicherlich nicht repräsentativ für die jeweilige Rasse. Jedoch bestätigen diese Untersuchungsergebnisse, dass sich das Polyzystische Syndrom nicht nur auf die Rasse der Perserkatzen beschränkt.

Quelle: Internet, PKD statistic summary page www.indyweb.net/~lucky/stats.html

2.2.4 Klinische Nierenbefunde

Vergrößerte Nieren und Nierendysfunktionen treten bei Katzen zwischen dem 3. und 10. Lebensjahr auf. Das Durchschnittsalter der Tiere bei Auftreten von Symptomen einer Niereninsuffizienz liegt bei 7 Jahren (Biller et al., 1998).

Bereits bei der Geburt von Merkmalsträgern sind mehrere Mikrozysten bilateral in den Nieren vorhanden, die mit zunehmendem Alter größer werden. Es kommt zur Vergrößerung der Nieren sowie zur Beeinträchtigung der Nierenfunktion, was letztlich zum Nierenversagen führen kann. Die Wachstumsrate der Nierenzysten variiert bei ein und demselben Tier und auch zwischen den Tieren einer Familie sowie innerhalb genetischer Linien. Bei fortgeschrittener Erkrankung können Zysten die Oberfläche der Nieren überragen, so dass die Nierenoberfläche eine unregelmäßige Struktur annimmt. Das Sammelssystem der Nieren kann beeinträchtigt sein. Die Nierenzysten werden bei PKD positiven Katzen bilateral beschrieben. Im Verlauf der Erkrankung wird ein beträchtlicher Teil des Nierenparenchyms durch Zysten ersetzt (Biller, 2000), siehe dazu Abb. 10.

Abb.10: Nieren mit PKD Veränderungen in verschiedenen Stadien der Erkrankung



Normale Katzeniere



Niere einer 6 Wochen alten Katze mit PKD



Niere einer erwachsenen Katze mit PKD im Endstadium



**Hochgradiger
Zystenbefund in der
Niere einer Perserkatze,
männlich, kastriert, 14
Jahre**

Die Bilder zeigen Nieren in unterschiedlichen Stadien der Erkrankung im Vergleich zu einer gesunden Katzenniere (oberes Bild).

Quelle: CFA The Cat. Fanciers Association Health Committee [Internet]

2.2.5 Symptome

Mit der Ausdehnung der Zysten wird die Nierenfunktion zunehmend eingeschränkt, was zu einer chronischen Niereninsuffizienz führt und unweigerlich mit dem Tod des Tieres endet. Die Anzeichen dieser Erkrankung sind unspezifisch.

Folgende Symptome können beobachtet werden:

- Apathie
- Anorexie bzw. mangelnder Appetit
- Gewichtsverlust
- Polydipsie und Polyurie
- Evtl. Hämaturie
- Erbrechen und Durchfall sind möglich
- struppiges Haarkleid und dünner werdende Haut
- Mundgeruch

In welchem Alter das Tier erste Symptome entwickelt, ist nicht vorhersagbar.

Wie bereits erwähnt erkranken die betroffenen Katzen aufgrund des langsamen Fortschreitens der Krankheit in der Regel erst im höheren Lebensalter, so dass einige Tiere ihr Leben lang asymptomatisch bleiben können und an anderen natürlichen Ursachen sterben (The Feline PKD FAQ, 1999).

2.2.6 Pathologisch-anatomische Nierenbefunde

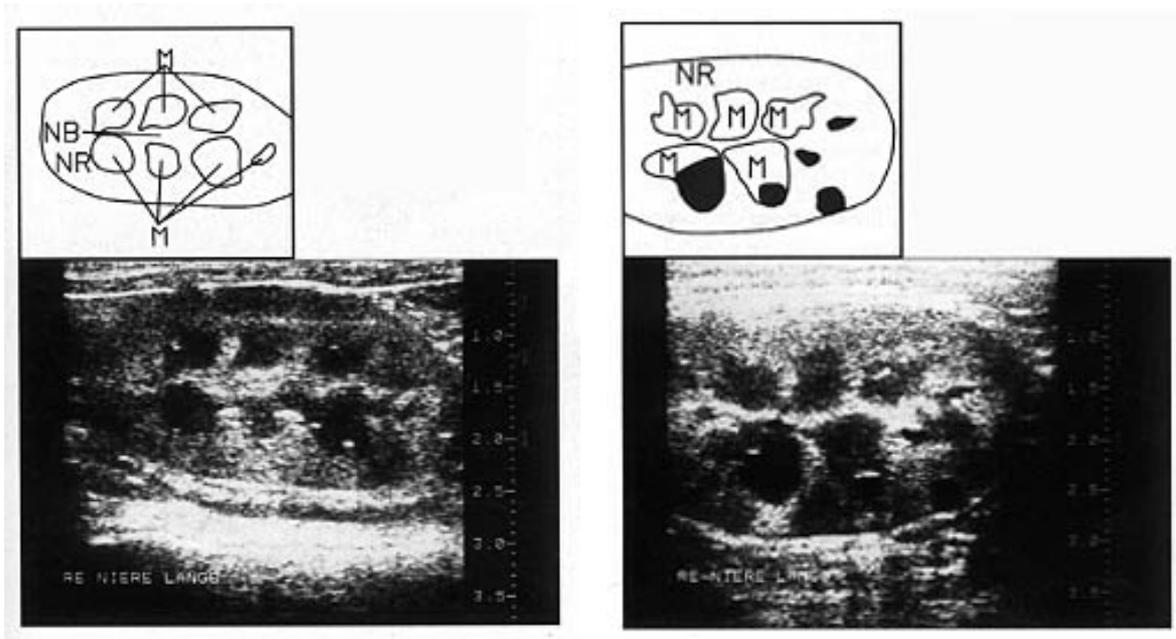
Die Zysten entstehen aus den proximalen und distalen Anteilen der Nephrone. Außer den Zysten im Nierenmark und in der Nierenrinde werden bei einigen Katzen auch Zysten in Leber und Pankreas angetroffen. Jedoch sind Leberzysten im Gegensatz zum Menschen (30 - 60% aller ADPKD Patienten) bei Katzen eher selten (< 10% der betroffenen Tiere) anzutreffen. Möglicherweise steht dies im Zusammenhang mit dem geringen Alter der Katzen, da das Auftreten von Leberzysten beim Menschen mit dem Alter zunimmt (Eaton et al., 1997; Biller S, Informationsbroschüre von Royal Canine). Untersuchungen an 22 betroffenen Katzen an der Ohio State University ergaben Zysten, die in ihrer Größe von < 1mm bis zu > 20mm und in ihrer Anzahl von 20 bis > 200 pro Niere variierten (Eaton et al., 1997). Laut Biller weisen ältere Tiere grössere und zahlreichere Zysten auf. Auch konnte eine Translokation der Na-K-ATPase, ähnlich wie bei der humanen ADPKD, festgestellt werden, jedoch war dies in keinem der Fälle vollständig. In einigen Zysten war die basolaterale Lokalisation der Na-K-ATPase beibehalten. An der Basalmembran der Zysten konnten keine Veränderungen gegenüber der normalen Basalmembran der Nierenkanälchen festgestellt werden (Eaton et al., 1997).

2.2.7 Diagnose

Palpatorisch können erst im fortgeschrittenen Stadium vergrößerte Nieren festgestellt werden.

In ihrer Anfangsphase ist das Polyzystische Syndrom weder durch eine physische Untersuchung noch durch die üblichen Laboruntersuchungen klar zu diagnostizieren oder auszuschließen. Ein bildgebendes Verfahren (Ultraschall) ist daher für die Erstellung einer Diagnose notwendig. Ultraschall ist ein empfindliches, nicht invasives technisches Verfahren, welches die Diagnose schon in einem sehr frühen Krankheitsstadium erlaubt, jedoch ist die Richtigkeit der Interpretation stark von dem Einsatz einer ausreichend guten Ausrüstung und von einer entsprechenden Erfahrung der untersuchenden Person abhängig. Um auch sehr kleine Zysten zu erkennen, wird die Anwendung eines Hochfrequenzschallkopfes (7 MHz oder höher) empfohlen.

Abb.11: Diagnose des Polyzystischen Syndroms mittels Ultraschall



Ultraschall-Längsschnitt einer unveränderten Katzenniere; M=Nierenmark, NB=Nierenbecken, NR=Nierenrinde

Fünf Nierenzysten im Rinden- und Markbereich bis 60mm Durchmesser, Nierenlängsschnitt, Perserkatze, männlich, 3 Jahre; schwarze Areale = Zysten



Ultraschallbild einer 8 Wochen alten Katze mit PKD



Ultraschallbild einer erwachsenen Katze mit 3 Zysten (positiv für PKD) im Endstadium PKD

Die Bilder zeigen Ultraschallaufnahmen von verschiedenen Katzenieren. Das Bild oben links zeigt die Aufnahme einer unveränderten Katzeniere. Die Bilder oben rechts, unten links und unten rechts zeigen Ultraschallaufnahmen von Katzenieren mit Zysten in unterschiedlichen Stadien der PKD Erkrankung.

Quelle: Internet, www.juhuKatzen.de/wissenswertes/PKD/pkd-deutsch.html

Im frühen Krankheitsstadium kann das Nierenparenchym mit Ausnahme von einer oder mehreren kleinen (1-2 mm) Zysten normal aussehen. Üblicherweise sind Zysten unterschiedlicher Größe feststellbar. Bei fortgeschrittenem Krankheitsverlauf können die zentralen Nierensinusechos durch größere Zysten verzerrt sein. In der Zystenwand können hoch echogene Schnittstellen mit Schatten, die auf Kalzifikation hindeuten, vorhanden sein. Auch sind Septierungen der Zysten möglich.

Ultraschalluntersuchungen (US) sollten für ein aussagekräftiges Ergebnis frühestens im Alter von 8 Wochen durchgeführt werden, da die Zysten im Anfangsstadium sehr klein und oft nur schwer darstellbar sind.

Im Alter von 10 Monaten kann die Erkrankung mit einer 95%igen Sicherheit diagnostiziert werden.

2.2.8 Differentialdiagnose

Nierenzysten sind in der allgemeinen Katzenpopulation eher selten. Folgende Zystenarten und Zystenformen können jedoch vorkommen:

Parasitäre Zysten

Nur selten erreichen parasitäre Zysten eine derartige Größe, dass sie klinische Symptome hervorrufen. Amöben und Echinokokkuszysten, Zystizerken, findet man vor allem in der Leber, können aber auch vereinzelt in Niere, Milz, Herz, Lunge oder Bauchhöhle angetroffen werden.

Retentionszysten

Zur Zystenbildung kommt es hier infolge einer Abflußbehinderung des Sekretes. Zu nennen wäre hier die selten vorkommende Zystenniere, bei der es sich um eine Missbildung handelt. Die harnbildende und harnableitende Harnwege haben keine Verbindung miteinander, so dass es zur Entstehung zahlreicher kleiner Zysten kommt.

Exudationszysten

Hierbei handelt es sich um Flüssigkeitsansammlungen in der Niere, bedingt durch eine Entzündung, wobei es zum Austritt von Flüssigkeit und Zellen aus Blutgefäßen und Lymphbahnen kommt.

Hydronephrose

Die Harnstauungsniere kann angeboren oder erworben sein und betrifft vor allem das Nierenbecken.

Weiterhin ist differenzialdiagnostisch zu berücksichtigen: Die durch FIP (feline infektiöse Peritonitis) bedingte granulomatöse Nephritis, Lymphome und die Perinephritische Pseudozyste, wobei Flüssigkeit die Niere umgibt.

2.2.9 Therapie

Eine kausale Therapie existiert nicht.

Die Behandlung entspricht der Behandlung des chronischen Nierenversagens unabhängig von der Ätiologie.

Folgende Maßnahmen können den Krankheitsverlauf möglicherweise verlangsamen:

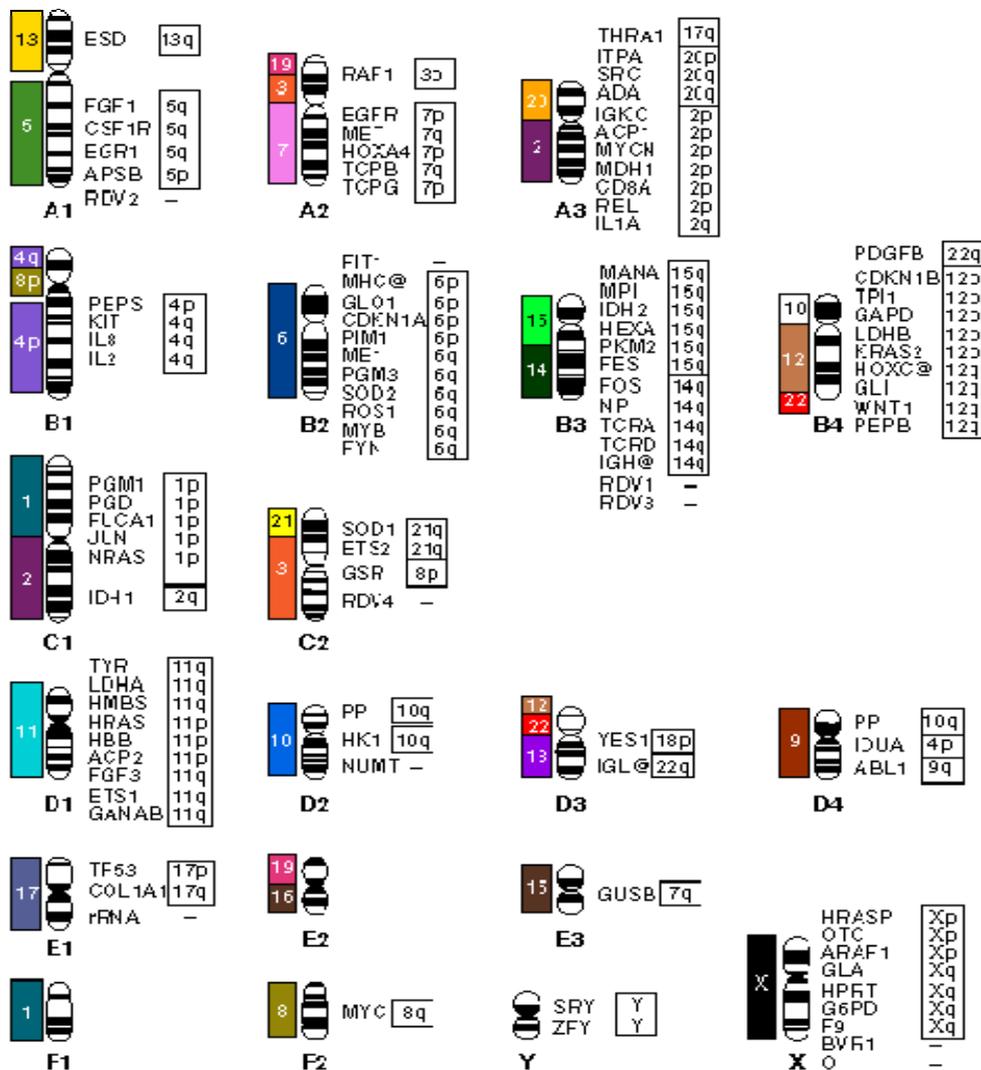
- Proteinarme und phosphatarme Diät
- Ausschließlich biologisch hochwertiges Protein
- Frisches Wasser ad libitum
- Antibiotika, möglichst lipophile aufgrund besserer Zystenpenetranz
- evtl. Behandlung der Anämie

Vorrangige Bedeutung hat die Diagnose der Erkrankung bei den betroffenen Tieren und die Aufklärung der Besitzer über die möglichen Folgen eines Zuchteinsatzes von PKD positiven Tieren. Die derzeitige Definition für das Polyzystische Syndrom sind multiple Zysten in beiden Nieren. Hier ist jedoch Vorsicht geboten, da bei erwachsenen Katzen per Ultraschall sowohl eine einzige wie auch multiple Zysten in nur einer Niere beschrieben wurden. Eine Katze mit nur einer Zyste hatte PKD positive Nachkommen (Biller, 2000).

2.3 Chromosomale Lokalisation des PKD Gens bei der Katze (Felis catus)

Für die Chromosomen der Katze wurde in der Reading Konferenz empfohlen, das System der San Juan Konferenz zu übernehmen, in welchem die Autosomen in Gruppen (A-F) eingeteilt werden. In jeder Gruppe sind die Paare numeriert, wobei jedesmal mit 1 begonnen wird. Insgesamt besitzt die Katze 38 Chromosomen, davon 36 Autosomen und zwei Gonosomen XX bzw. XY (Herzog, 1995).

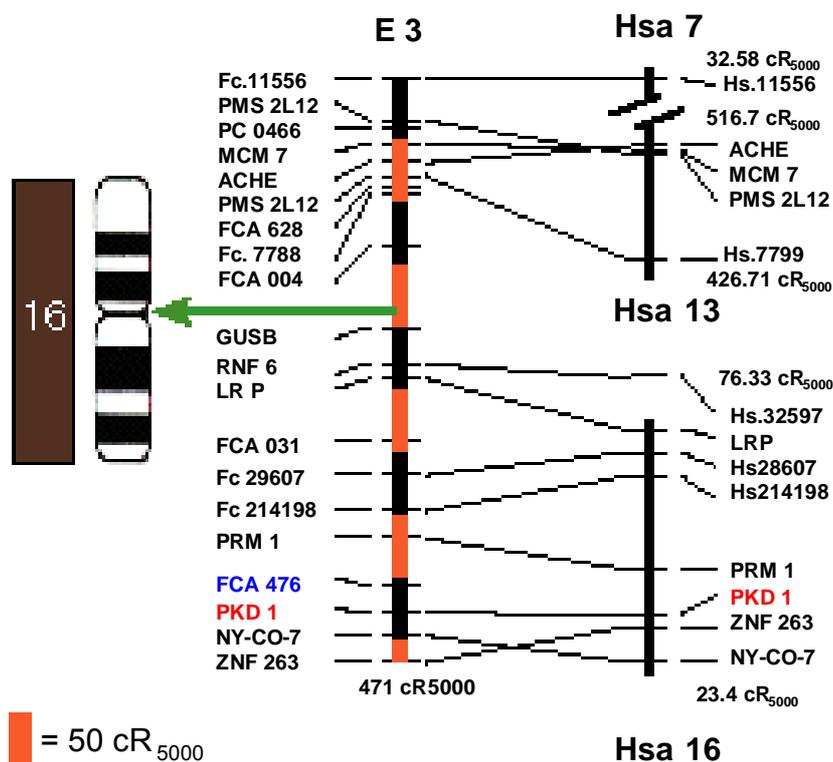
Abb.12: Die genetische Karte der Hauskatze (Felis catus)



Die genetische Chromosomenkarte der Hauskatze (felis catus). Die Gensymbole basieren zum größten Teil auf der humanen Genomenklatur. Die Zahlen in den Kästchen (rechts der Gensymbole) beziehen sich auf die humanen Chromosome, zu welchen die homologen Katzengene zugeordnet wurden. Quelle: O'Brian et al., 1997

Es ist bekannt, dass ganze Abschnitte von gekoppelten Genen durch die Evolution hinweg unverändert beibehalten wurden. Diese Abschnitte können intakt im Genom von Spezies existieren, die so unterschiedlich sind wie Mensch und Fliege. Diese konservierten Segmente reflektieren eine ursprüngliche genomische Organisation, die über die Evolution hinweg vererbt wurde. Das Genom der Katze beweist eine hohe konservierte Organisation in Relation zum humanen Genom (O'Brian et al., 1997). Bei über 30 Erbkrankheiten der Katze wurden Analogien zu den pathologischen Veränderungen der entsprechenden humanen Erkrankung beschrieben (Migaki, 1982; Nicholas und Harper, 1996; Nicholas et al., 1996). Das Homolog zum PKD1 Gen des Menschen wurde dem Katzenchromosom E3 zugeordnet. Der Typ II Marker FCA 476 und der Typ I Marker NY-CO-7 flankieren das PKD1 Gen der Katze laut einer Karte des *Laboratory of Genomic Diversity*.

Abb.13: Das Chromosom E3 der Katze



Die *radiation hybrid* Karte des Chromosoms E3 der Hauskatze im Vergleich mit der humanen *radiation hybrid* Karte. Auf der linken Seite befindet sich das Katzenchromosom E3 mit den angegebenen Positionen der einzelnen Marker und Genorte. Rechts abgebildet sind die humanen *radiation hybrid* Karten. Der größte Teil der feline Mikrosatelliten ist mit dem Präfix FCA oder F gekennzeichnet. Der grüne Pfeil bezeichnet die abgeleitete Position des Centromeres auf der *radiation hybrid* Karte. Der in dieser Arbeit verwendete Markergenort, FCA 476 liegt in der Nähe des PKD1 Gens und ist blau dargestellt.

Quelle: [Internet] *Laboratory of Genomic Diversity*, <http://rex.nci.nih.gov/lgd/genmaps/e3prh.htm>

Aufgrund dieser Informationen soll in dieser Arbeit versucht werden, eine Kopplung des Krankheitsgenortes für das Polyzystische Syndrom der Katze mit dem Marker FCA 476 nachzuweisen. Der Marker FCA 476 wurde gewählt, weil es sich um einen Typ II Marker handelt, der eine Längenpolymorphismus aufweist und weil er zudem in der Nähe des PKD1 Gens zu finden ist. Bei dem zweiten an das PKD1 Gen angrenzenden Marker NY-CO-7 handelt es sich um einen Typ I Marker, bei dem mit einem Längenpolymorphismus nicht zu rechnen ist. Ziel dieser Studie ist es zu überprüfen, ob PKD1 als das verursachende Gen für das Polyzystische Syndrom verantwortlich ist.

3 Material

3.1 Probenmaterial

Bei den Proben handelte es sich um jeweils ca. ein ml Blut von Perser und Exotic Shorthair Katzen, die zum Zwecke der Ultraschalluntersuchung auf das Polyzystische Syndrom, in der Chirurgischen Veterinärklinik der Justus-Liebig-Universität vorgestellt wurden. Die Tiere wurden sonographisch auf das Polyzystische Syndrom untersucht und die Blutproben wurden uns umgehend zugestellt. Die Aufbewahrung bis zur Weiterverarbeitung erfolgte bei -80°C . Sofern vorhanden, wurden die Blutproben mit einer Kopie des zugehörigen Stammbaumes der jeweiligen Katze geliefert. Zusätzlich wurden Kopien von Stammbäumen und Untersuchungsbefunden weiterer Katzen, jedoch ohne Blutprobe zur Auswertung zur Verfügung gestellt. So war es möglich, eine Datenbank anzulegen, um die Familienverhältnisse zu ermitteln und die vielfältigen Informationen zu verarbeiten. Aus Gründen des Datenschutzes wurden den einzelnen Tieren Nummern zugewiesen.

Insgesamt wurden in dieser Arbeit 175 Blutproben untersucht, wovon 58 Blutproben von männlichen und 96 Blutproben von weiblichen Tieren stammte. Bei 21 Blutproben war das Geschlecht der Tiere unbekannt. Die vorangegangene Ultraschalluntersuchung diagnostizierte 80 Tiere als negativ und 91 Tiere positiv hinsichtlich dem Vorhandensein von Nierenzysten. Bei vier Tieren lag kein Ergebnis dieser Untersuchung vor.

3.2 Chemikalien

3.2.1 Verwendete Chemikalien

Aceton	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Acrylamid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Ammoniumpersulfat	SIGMA, Taufkirchen
Ampicillin	SIGMA, Taufkirchen
Biozym Agarose DNA	Biozym, Hess. Oldendorf
Biozym Agarose small DNA	Biozym, Hess. Oldendorf
Bis-Acrylamid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Borsäure	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Chloroform	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
D-(+)-Saccharose	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Diethylether	Merck, Darmstadt
Dimethylchlorsilan	SIGMA, Taufkirchen
EDTA Dinatriumsalz Dihydrat	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Entwickler	Tetenal Photowerk GmbH, Norderstedt
Ethanol 99%ig	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Ethidiumbromid (10mg/ml)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Fixierer Superfix	Tetenal Photowerk GmbH, Norderstedt
Formamid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Glucose	Merck, Darmstadt
Glycerin	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Größenstandard puC/HaeIII	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Größenstandard puC 19/HpaII	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Harnstoff	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Hyperfilm-MP (Röntgenfilm)	Amersham, Freiburg
Kaliumacetat	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Kaliumchlorid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Low DNA Mass Ladder	Gibco BRL, Eggenstein

Magnesiumsulfat – Heptahydrat	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Mass Ruler DNA Ladder, Low Range	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Natriumacetat – Trihydrat	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Natronlauge	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Nonidet P40	Sigma, Taufkirchen
Peptone from casein	Serva, Heidelberg
Proteinase K	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
pUC18 DNA	MBI, St. Leon-Rot
Restriktionsendonuclease Bsh1236I (FnuDII)	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Restriktionsendonuclease HindIII	SIGMA, Taufkirchen
Restriktionsendonuclease HinfI	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Rotiphorese®	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Saccharose	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Sodium Dodecyl Sulfat, SDS	Serva, Heidelberg
TEMED	Serva, Heidelberg
TRIS	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Xylen Cyanol	Merck, Darmstadt
Yeast extract SERVABACTER®	Serva, Heidelberg
γ-Methacryloxypropyltrimethyloxysilan	SIGMA, Taufkirchen

3.2.2 Spezielle Chemikalien und Kits

3.2.2.1 Polymerase-Ketten-Reaktion

HotStarTaq DNA Polymerase	Qiagen GmbH, Hilden
10xPCR Puffer	Qiagen GmbH, Hilden
Desoxynukleosidtriphosphate Mix (dNTPs) (dATP, dCTP, dGTP, dTTP je 10mM)	Sigma, Taufkirchen
Nukleotid [alpha-P32] dCTP	Hartmann Analytik GmbH, Braunschweig
Magnesiumchlorid	Qiagen GmbH, Hilden
Acetamid	Sigma, Taufkirchen

Primer	MWG Biotech GmbH, Ebersberg
Qiagen Purification Kit®	Quiagen, Hilden
Nucleo Spin Extract® 2 in 1	Macherey-Nagel, Düren

3.2.2.2 Klonierung

IPTG	Invitrogen, Karlsruhe
X-Gal	Invitrogen, Karlsruhe
Ampicillin	Sigma, Taufkirchen
TOPO TA Cloning® Kit	Invitrogen, Karlsruhe
Peptone	Serva GmbH, Heidelberg
Yeast extract	Serva GmbH, Heidelberg
Agar-Agar	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Nucleobond® cartridges AX20	Macherey-Nagel, Düren

Alle verwendeten Chemikalien wurden in der höchsten erhältlichen Qualität bezogen und nach Herstellerangaben gelöst und aufbewahrt.

3.3 Geräte und Laborbedarf

3.3.1 Geräte und Gebrauchsgegenstände

Belichtungsgerät	Molecular-Packard, Frankfurt a. M.
Dokumentation	Kodak Digital Science™ DC120
Elektrophorese Netzgerät	Desatronic 3000/200, Desaga, Heidelberg
Glasgeräte	Schott, Mainz
Heizrührer	Jahnke & Kunkel, Staufen
Horizontale Elektrophoresekammer	BioRad® Sequencing Cell, München
Netzgerät	MWG, München
pH-Meter	WTW, Weilheim
Photometer	Pharmacia Biotech, Freiburg
Pipetten	Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg
Practica Spiegelreflexkamera	Pentacon, Dresden
UV-Illuminator	Bachofer GmbH, Reutlingen

UV-Stratalinker	Stratagene, Heidelberg
Vertikale Elektrophoresekammer	BioRad® Sequencing Cell, München
Vortexer	Heidolph, Kelheim
Wasserbad	Julabo, Seelbach
Zentrifugen	Heraeus, Hanau

3.3.2 Verbrauchsmaterialien

Kulturschalen Typ: Falcon 3033	Becton Dickinson, Heidelberg
Reaktionsgefäße	Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg
Pipettenspitzen	Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg
Sterilfilter (0,2 mm Porenweite)	Sartorius, Göttingen

3.4 Auswertungs-Software

Dnasis, entwickelt von Hitachi Software, Engineering Company Ltd
 OLIGO™, MBI Molecular Biology Insights Inc., USA

3.5 Lösungen und Puffer

1 x TE Puffer:

10 mM Tris	0,5 ml einer 2 M Tris Lösung pH 7,4
0,1 mM EDTA	20 µl einer 0,5 M EDTA Lösung pH 8
	H ₂ O bidest ad 100 ml

Proteinase K Puffer:

20 mM Tris	1 ml einer 2 M Tris Lösung pH 7,4
4 mM EDTA	800 µl einer 0,5 M EDTA Lösung
100 mM NaCl	2 ml einer 5 M NaCl Lösung
	H ₂ O bidest ad 100 ml

Proteinase K Stammlösung:

10 mg Proteinase-K

1 x TE ad 1 ml

SDS 10%:

100 g SDS

H₂O bidest ad 1 L

Ethanol 70%:

700 ml Ethanol 99%

H₂O bidest ad 1 L

10 x TBE Puffer:

0,86 M Tris

108 g Tris

0,86 M Borsäure

55 g Borsäure

0,2 M EDTA

7,44 g EDTA

H₂O bidest ad 1 L

Auftragspuffer („loading dye“):

0,25% Xylolcyanol

25 mg Xylolcyanol

0,25% Bromphenolblau

25 mg Bromphenolblau

40% Saccharose

4,0 g Saccharose

1xTBE Puffer ad 10 ml

LB (Luria-Bertani) Flüssigmedium:

10 g *Bacto Tryptone* / Peptone

5 g *Bacto Yeast Extrakt*

10 g NaCl

H₂O bidest ad 1 L

Mit NaOH den pH Wert auf 7,4 einstellen.

Das Medium autoklavieren und anschließend mit 50 mg Ampicillin versetzen.

Herstellung der LB (Luria-Bertani) Agar Kulturplatten:

10 g *Bacto Tryptone* / Peptone

5 g *Bacto Yeast Extrakt*

10 g NaCl

H₂O bidest ad 1 L

Mit NaOH den pH Wert auf 7,4 einstellen.

Nach der Zugabe von 15 g Agar das Medium autoklavieren und nach Abkühlung auf 50°C mit 50 mg Ampicillin versetzen. Das noch flüssige Medium in Kulturschalen giessen.

Nach der Verfestigung den Agar mit 40 µl IPTG (25 ng/ml) und 40 µl X-Gal (40 µg/ml) bestreichen.

Lösung I für Miniprep

50 mM Glukose

450 µl einer 20% igen Glucoselösung

25 mM Tris pH 8

0,2 ml einer 0,5 M EDTA Lösung

10 mM EDTA

0,25 ml einer 1 M Tris Lösung pH 8

H₂O bidest ad 10 ml

Lösung II für Miniprep

0,2 N NaOH

4 ml einer 5 M NaOH Lösung

1% SDS

10 ml einer 10% igen SDS Lösung

H₂O bidest ad 100 ml

Lösung III für Miniprep

3 M Kaliumacetat pH 4,8

4 Methoden

4.1 DNS Isolierung aus Blutproben mittels Aussalzmethode

4.1.1 Prinzip

Verschiedene physikalische und chemische Eigenschaften von Zellen bzw. Nukleinsäuren macht man sich für die Isolierung der DNS zunutze. Zunächst kommt es durch die osmotischen Verhältnisse und Zugabe eines nichtionischen Detergenz (Nonidet P40) zur Lyse der Zellen. Durch anschließendes Zentrifugieren werden die Zellkerne abgetrennt. Die Auflösung der Zellkerne erfolgt durch Behandlung mit einem Detergenz, was zur Freisetzung der DNS und Denaturierung der Proteine führt. Denaturierte Proteine werden von dem Enzym Proteinase K abgebaut. Nach Zugabe von 1/3 Volumen gesättigter Salzlösung erfolgt eine Trennung durch Zentrifugation. Durch Präzipitieren der Nukleinsäuren mit Alkohol, wobei sich diese zu Komplexen zusammenlagern, gewinnt man die DNS. 1 x TE Puffer wird zur Resuspension und Lagerung der DNS verwendet.

4.1.2 Durchführung

In einem 15 ml Röhrchen wurden 3,33 ml einer 0,18 M NaCl Lösung vorgelegt. Anschließend wurde 1 ml Blut zugegeben und mit Wasser ad 5 ml aufgefüllt.

Nach der Zentrifugation für 10 min bei 3500 x g wurden 1,66 ml einer 0,14 M NaCl Lösung zugegeben und das Ganze durch Mischen resuspendiert.

Mit einer 0,14 M NaCl Lösung wurde auf 5 ml aufgefüllt und ein weiteres Mal für 10 min bei 3500 x g zentrifugiert.

Der Überstand wurde dann bis auf ca. 0,5 ml abgesaugt. Diese Schritte wurden mindestens zwei mal wiederholt.

Nach der Zugabe von 1,66 ml 0,1% Nonidet P40 wurde die Probe durch Mischen resuspendiert und mit 0,1% Nonidet P40 auf 5 ml aufgefüllt.

Nach der Zentrifugation für 10 min bei 3500 x g wurde der Überstand vollständig verworfen.

Das Pellet konnte im Anschluss in 333 µl 1 x Proteinase K Puffer resuspendiert werden.

Nach der Zugabe von 16,6 µl Proteinase K Stammlösung und 23,33 µl SDS 10% wurde die Probe im Wasserbad bei 37°C über Nacht inkubiert. Mit 1 x Proteinase K Puffer wurde auf 1 ml aufgefüllt und 330 µl einer 6 M NaCl Lösung zugegeben.

Nach der Zentrifugation für 10 min bei 3500 x g wurden der Überstand in ein Becherglas überführt und durch Zugabe von Ethanol 99% präzipitiert.

Im Anschluß konnte das Ethanol vorsichtig abgesaugt werden.

Mit Ethanol 70% wurde das Präzipitat gewaschen und danach in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt.

Nach dem Trocknen der DNS wurde die Probe in 50 µl 1xTE Puffer resuspendiert.

4.2 Polymerasekettenreaktion (PCR)

4.2.1 Prinzip

(Dargestellt anhand Newton und Graham, 1994)

Die PCR ist eine in vitro Technik, mit der man gezielt DNS Abschnitte, die von zwei bekannten DNS Sequenzen flankiert werden, vervielfältigen kann. Als Starthilfe für die PCR benötigt man Primer, sogenannte Amplimere. Diese kurzen, einzelsträngigen DNS Moleküle sind zu einem Abschnitt einer definierten Sequenz, der DNS Matrize (*Template*), komplementär. Damit die DNS Matrize einzelsträngig vorliegt, wird diese zunächst durch hohe Temperatur denaturiert. Bei einer primerspezifischen Temperatur kommt es zu deren Anlagerung (*Annealing*) an die komplementären Sequenzabschnitte. Anschließend verlängert eine DNS Polymerase unter entsprechenden Reaktionsbedingungen und in Gegenwart von Desoxynukleosidtriphosphaten (dNTPs) die Primer entlang der denaturierten DNS Matrize in 5' → 3' Richtung. So werden neue DNS Stränge mit zur Matrize komplementärer Sequenz synthetisiert. Die neu synthetisierten DNS Stränge, die im weiteren Verlauf auch wieder als Matrize dienen, liegen am Ende der Reaktion doppelsträngig vor. Während in den ersten zwei Zyklen die DNS Stränge noch keine definierte Länge haben, weil die Polymerase solange DNS synthetisiert bis sie entweder von allein anhält oder vom Beginn eines neuen Zyklus unterbrochen wird,

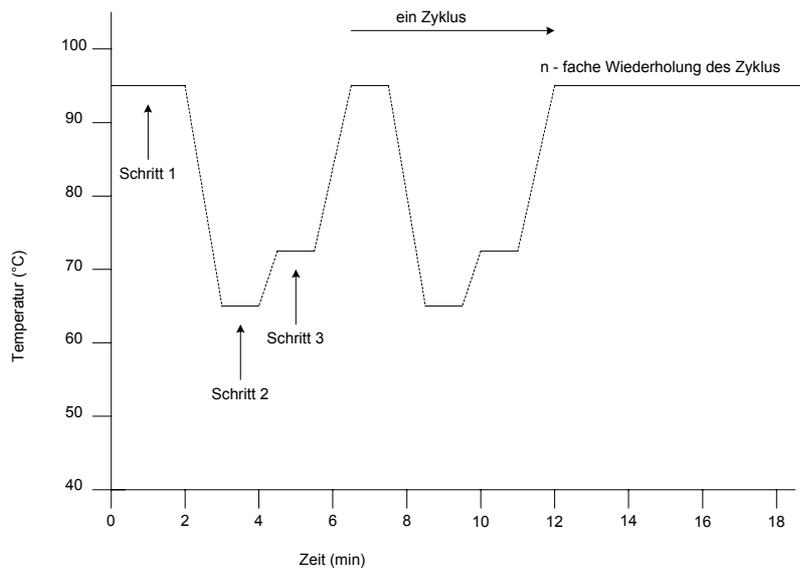
entstehen in den folgenden Zyklen nur noch sogenannte Zielsequenzen, deren Länge durch die Position der Primer in der Originalmatrize vorgegeben ist. Mit jedem neuen Zyklus der PCR steigt im Idealfall die Konzentration der Zielsequenz exponentiell an. Die Kopienzahl der Zielsequenz lässt sich anhand der Gleichung $N_n = N_0 \times 2^n$ berechnen.

Wobei:

- N_n = die DNS Menge in n Zyklen
- n = Anzahl der Vermehrungszyklen
- N_0 = Anzahl der Kopien der ursprünglichen DNS Matrize

Die Effizienz einer PCR ist von Matrize zu Matrize unterschiedlich. Setzt man eine 100%ige Ausbeute voraus, so hat sich die Anzahl der PCR Produkte, auch Amplikons genannt, nach 20 Zyklen auf das 2^{20} fache vermehrt. Aufgrund von verschiedenen limitierenden Faktoren beschränkt man die Anzahl der Zyklen einer PCR in der Regel auf 20 bis 40. Ein begrenzender Faktor für die Reaktion ist die kontinuierliche Abnahme der Enzymaktivität. Zudem konkurrieren die neugebildeten Stränge bei zunehmender Konzentration mit den Primern um die Hybridisierungsstellen. Die Effektivität der Vervielfältigung wird somit vermindert, während gleichzeitig die Anzahl von unspezifischen Vermehrungsprodukten relativ zu der "Ziel"-Sequenz ansteigt.

Abb.14: Der zyklische Temperaturverlauf der PCR



Die Grafik stellt den zyklischen Temperaturverlauf der PCR dar. Schritt 1 führt , bei einer Temperatur von 95°C zur Denaturierung der DNS. Schritt 2 führt zur Anlagerung der Primer bei einer für diese spezifischen Temperatur. Der Schritt 3 stellt die Verlängerungsphase bei 72°C dar.
Quelle: Newton und Graham, 1994

Die PCR wird in drei Schritte gegliedert:

1. Denaturierung

Bei einer Denaturierungstemperatur, in der Regel von 95°C, entstehen durch Lösen der Basenpaarungen DNS Einzelstränge, die in der nächsten Syntheserunde als Matrize dienen.

2. Annealing

Bei einer Hybridisierungstemperatur binden die Oligonukleotidprimer an die denaturierte Matrize. Die ideale Hybridisierungstemperatur muß einerseits so niedrig sein, dass es zur Hybridbildung zwischen Primer und Matrize kommt, jedoch so hoch, dass sich keine fehlgepaarten (unspezifischen) Hybride bilden. Die Annealing Temperatur sollte 2°C - 4°C unter der Schmelztemperatur (T_m) der Primer liegen. Die T_m wird nach folgender Formel berechnet:

$$T_m = (4x(G+C)) + (2x(A+T)) \text{ °C}$$

wobei G für Guanin, A für Adenin, T für Thymin und C für Cytosin steht.

Dabei ist (G+C) die Anzahl der G und C Nukleotide in der Primersequenz und (A+T) entsprechend die Anzahl von A und T Nukleotiden. Die Schmelztemperatur eines AT Basenpaares ist niedriger als die eines GT Paares, daher sollte man schon bei der Wahl der Primer auf ein ausgewogenes AT/GC Verhältnis achten.

3. Elongation

In dieser Phase werden die Primer für gewöhnlich bei 72°C verlängert.

4.2.2 Taq Polymerase

Taq DNS Polymerasen sind Enzyme, die aus einzelnen Desoxynucleosidtriphosphaten lange Polynukleotidketten bilden. Die Polymerisation der DNS schreitet vom 5'- α -Phosphat des Desoxynucleosidtriphosphats in Richtung der endständigen 3'-Hydroxylgruppe des wachsenden DNS Stranges fort.

Die Taq DNS Polymerase ist ein hitzestabiles Enzym, dessen optimale Temperatur bei 70-80°C liegt. In diesem Temperaturbereich synthetisiert das Enzym mit einer Geschwindigkeit von 35 bis 100 Nucleotiden pro Sekunde.

Die hier verwendete HotStarTaq DNS Polymerase besitzt als besondere Eigenschaft, dass sie 15 Min vor dem eigentlichen PCR Lauf hitzeaktiviert werden muß. Dies hat den Vorteil, dass es bei der Lagerung sowie bei der Handhabung weder zu einem Aktivitätsverlust noch zur Bildung von Primer Dimeren oder anderen unspezifischen Produkten kommen kann. Die Polymerase wurde in einer Endkonzentration von 0,05 U/ μ l eingesetzt.

4.2.3 Desoxynucleosidtriphosphate (dNTPs)

Die Polymerase setzt die einzelnen Desoxynucleosidtriphosphate zu einem DNS Strang zusammen. Ein Baustein besteht jeweils aus einer der vier Basen, Adenin (A), Thymin (T), Guanin (G) oder Cytosin (C) und einem Zuckermolekül, einer Desoxyribose, welche über Phosphatgruppen verknüpft werden. Die optimale Konzentration der Nucleotide (dNTPs) für die PCR hängt von verschiedenen Faktoren, wie Stringenz der Reaktion, Konzentration der Primer, Länge der DNS Kopien und der MgCl₂ Konzentration ab.

Die hier verwendete fertige Mischung aller vier dNTP Moleküle wurde in einer Endkonzentration von 0,2 mM eingesetzt.

4.2.4 Puffer

Verwendet wurde der für die Polymerase mitgelieferte zehnfach konzentrierte Puffer. Der Puffer setzt sich aus TrisHCl, KCl, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ sowie 15 mM MgCl_2 zusammen und hat einen pH von 8,7 (20°C). In der Reaktionslösung liegt der Puffer einfach konzentriert vor.

4.2.5 MgCl_2

Mg^{2+} Ionen bilden zusammen mit Nukleosidtriphosphaten einen löslichen Komplex, der somit der Polymerase zum Einbau zur Verfügung steht. Weiterhin wird die Polymeraseaktivität durch die Magnesiumionen stimuliert und die Schmelztemperatur (T_m) erhöht sich. Die Endkonzentration liegt in der Regel im Bereich von 0,5 - 5,0 mM und wird experimentell festgestellt. Hier verwendete MgCl_2 Konzentrationen variieren und sind bei den jeweiligen Reaktionsansätzen angegeben.

4.2.6 Hemmstoffe und Beschleuniger

Viele verschiedene Faktoren und Substanzen nehmen Einfluß auf die PCR, so ist je nachdem, welches biologische Material bzw. welche Methode und Reagenzien zur DNS Extraktion verwendet werden, mit unterschiedlichen Inhibitoren zu rechnen.

Um die Effektivität bzw. die Spezifität der Reaktion zu steigern, werden von vielen Wissenschaftlern unterschiedliche Substanzen der PCR zugesetzt, auch wenn deren spezifische Wirkungsweise nicht immer aufgeklärt ist.

Bei einigen der hier verwendeten Reaktionsansätze wurde Acetamid in einer Endkonzentration von fünf Prozent zugegeben. Acetamid verringert das nichtspezifische Annealing der Primer und erhöht somit die Spezifität der PCR (Reysenbach et al., 1992).

4.2.7 DNS Matrize

Als Substrat für die PCR kam doppelsträngige DNS, die aus Blut gewonnen wurde, zum Einsatz.

4.2.8 Primer

Grundsätzlich ist auf eine Länge der Primer zwischen 20 und 30 Nukleotiden, deren AT/CG Verhältnis möglichst ausgeglichen sein soll, zu achten. Insbesondere am 3'-Ende sollten weder inter- noch intramolekular komplementäre Sequenzen auftreten, um eine Primerdimerbildung und damit das Auftreten von kurzen falschen DNS Stücken zu verhindern. Positiv wirkt sich auch eine Schmelztemperatur (T_m) von mindestens 70°C aus, wobei keine große Differenz zwischen den Schmelztemperaturen der beiden Primer bestehen soll.

Getestet wurden mehrere Primerpaare, die zum einen aus der Literatur ausgewählt und zum anderen selbst konstruiert wurden. Als Vorlage für die selbst entwickelten Primer diente die Sequenz des humanen PKD1 Genes. Die Primer wurden so entwickelt, dass sie im Exon liegend mindestens ein Intron flankierten. Die Lage wurde aufgrund der größeren genetischen Heterogenität in einem Intron und der damit verbundenen höheren Wahrscheinlichkeit, genetische Polymorphismen, auch in einer eng gezüchteten Population aufzuspüren, gewählt. Dieser Teil des Genoms ist nicht in die direkte Regulation oder Spezifikation von Genprodukten involviert, so dass Mutationen in diesen nicht kodierenden Regionen keinen phänotypischen Effekt haben und somit selektionsneutral sind.

Folgende Primer wurden selbst entworfen:

PKD5-8f 5' CTC CTT TGC CTG CCT GTC CCT CTG CT 3'

Lage im humanen PKD1 Gen im Exon 5 von Base 17672 - 17692

PKD5-8r 5' CTG AGA GGC CGT CCT GCT GTG CCA GA 3'

Lage im humanen PKD1 Gen im Exon 8 von Base 19368 – 19393

PCR Ansatz:

0,25 pmol/µl je Primer

0,20 mM dNTPs

2,00 mM MgCl₂

1 x Reaktionspuffer

5% Acetamid

0,05 U/µl Taq Polymerase

Die eingesetzte Menge an DNS Ausgangsmaterial wurde variiert und unterschiedliche PCR Programme wurden getestet.

PKD9-11f1 5' GAA GCC TTC CTC ACC ACG GCC GAA T 3'

Lage im humanen PKD1 Gen im Exon 9 von Base 19857 - 19881

PKD9-11b1 5' GTG GCC ACC AGG GCA GGG CAG ACA T 3'

Lage im humanen PKD1 Gen im Exon 11 von Base 21534 – 21558

PCR Ansatz siehe Seite 65.

Als Ausgangsmaterial diente 1µl DNS Matrize der 1:10 verdünnten Originalproben.

PCR Programm siehe Anhang.

Folgende Primer wurden der Literatur entnommen:

In ihrem Artikel veröffentlicht Liu und Mitarbeiter zwei Primer für die canine DNS, mit deren Hilfe ein 0,4 kb langes Amplikon produziert wurde (Liu et al., 1998). Abgeleitet hatten sie die Primer aus den Sequenzen des Exon 41 und 42 des humanen PKD1 Genes.

Primer 1 5'-CTA CGT GCA GGA GCT GGG CCT GAG CC-3'

hier bezeichnet als PKDDOG1

Primer 2 5'-AGG CGC AGC GTG ACG GCG GCG TGC AG-3'

hier bezeichnet als PKDDOG2

Verwendeter PCR Ansatz und Ausgangsmaterial siehe oben.

Im PCR Programm wurde die Annealingtemperatur in vier Schritten mit jeweils zwei Zyklen von 72°C auf 65°C gesenkt. Mit der Annealingtemperatur von 65°C wurden dann 35 Zyklen durchlaufen. Für Details des PCR Programmes siehe Anhang.

Die hiermit erzielten PCR Produkte einer PKD positiv und einer PKD negativ geschallten Katze wurden aus dem Agarosegel gereinigt, kloniert und anschließend sequenziert. Die erhaltene Sequenz wurde nun zur Konstruktion eines katzenspezifischen Primers (PKDDOG3) verwendet.

PKDDOG3 5'-TGC AGC TGC ACA ACT GGA TCG ACA ACA-3'

Im weiteren Verlauf konnte dieser dritte Primer (PKDDOG3) zusammen mit dem Primer PKDDOG2 für eine sogenannte *seminested* PCR verwendet werden. Hierbei wurde eine erste PCR mit den Primern PKDDOG1 und PKDDOG2 durchgeführt, deren Produkt als Ausgangsmaterial für die zweite PCR diente. Um eine hohe Spezifität zu gewährleisten wurden dann in der zweiten PCR die Primer PKDDOG3 und PKDDOG2 verwendet.

Verwendeter PCR Ansatz für die *seminested* PCR siehe Seite 65.

Im weiteren wurde das *Touchdown* Programm der ersten PCR gekürzt. Für Details siehe Anhang.

Die aus der ersten PCR gewonnenen Amplikons wurde mit Hilfe von Agarosegelelektrophorese nachgewiesen und die entsprechenden Banden aus dem Gel gereinigt. In der zweiten PCR diente 1 µl des 1:100 verdünnten Produktes der ersten PCR als Ausgangsmaterial.

Das zweite PCR Programm durchlief 30 Zyklen mit einer Annealingtemperatur von 67°C. Für Details siehe Anhang.

Zur Amplifizierung kamen weiterhin zum Einsatz das Mikrosatelliten Primerpaar (FCA476), hier bezeichnet als

CAT476F 5'-GAC CTT GGA AGG AAA GGA GG-3'

CAT476R 5'-CCC TTT TCT CCA TGT TGT TAC T-3'

Diese Primer wurden einer Tabelle des *Laboratory of Genetic Diversity (LGD)* aus dem Internet (<http://rex.ncifcrf.gov/ccr/lgd/catgenome/animod.asp>) entnommen.

Verwendeter PCR Ansatz wie Seite 65, aber:

0,4 pmol/µl je Primer

0,25 Mm dNTPs

0,04 U/µl Taq Polymerase

Das PCR Programm durchlief 25 Zyklen mit einer Annealingtemperatur von 55°C.

Für Details siehe Anhang.

4.3 Radioaktive Markierung

4.3.1 Prinzip

Für die radioaktive Markierung von Nukleinsäuren kommen vor allem drei radioaktive Isotope zum Einsatz. Hierbei handelt es sich um ^{32}P , ^{33}P und ^{35}S , wobei die P Isotope in das Phosphatrückrat oder am 5'-Ende eines DNS oder RNS Stranges eingebaut werden. Bei dem Zerfall der Isotope wird jeweils ein hochenergetisches Elektron frei, ein sogenanntes β -Teilchen, was man sich beim Nachweis der markierten DNS bzw. RNS durch Autoradiographie zunutze macht. Hierbei wird ein Röntgenfilm, abhängig von der Intensität der Strahlung, für einen unterschiedlich langen Zeitraum exponiert. In dem so erhaltenen Autoradiogramm stellen sich markierte Nukleotidketten als Banden da. Zur Erhöhung der Nachweisempfindlichkeit werden die Gele vorher getrocknet. Das hier verwendete ^{32}P ist das energiereichste der drei Isotope und hat eine Halbwertszeit von 14,3 Tagen.

4.3.2 Durchführung

Im Anschluß an die Isolierung der DNS aus den Blutproben wurden PCR Läufe mit dem Primerpaar CAT476F und CAT476R durchgeführt. Die entstandenen Amplikons dieser PCR wurden wie auf Seite 67 beschrieben gewonnen. Jeweils 4 μl dienten als Ausgangsmaterial für die radioaktive Markierung. Da diese PCR nicht der Vervielfältigung diente, kam nur einer der Primer (CAT476F) zum Einsatz. Für die Markierung wurde $[\alpha\text{-P}^{32}]\text{dCTP}$ verwendet.

PCR Ansatz für die radioaktive Markierung:

0,4 pmol/ μl des Primers CAT476F

0,25 Mm dNTPs

2,00 mM MgCl_2

1 x Reaktionspuffer

0,04 U/ μl Taq Polymerase

0,2 μl $[\alpha\text{-P}^{32}]\text{dCTP}$

4 μl DNS Matrize der zuvor amplifizierten Proben

Das PCR Programm für die radioaktive Markierung durchlief 15 Zyklen mit einer Annealingtemperatur von 55°C. Für Details siehe Anhang.

Im Anschluß wurde jede Probe mit 4 µl Auftragspuffer versetzt, 3 Minuten bei 95°C denaturiert und zum Nachweis mit Hilfe eines Polyacrylamidgel (Spannung 600V, Laufzeit 2,5 Stunden) aufgetrennt. Nach dem Trocknen des Geles konnten die Banden durch Autoradiographie dargestellt und ausgewertet werden.

4.4 Mikrosatelliten

Bei der von dem Primerpaar CAT476 amplifzierten Sequenz handelt es sich um einen Mikrosatelliten Markergenort, einer 24fachen Wiederholung des Dinukleotides CA. Das Amplifikat soll eine Länge von 203 bis 213 Basenpaaren und einen Heterozygotiewert von 0,63 haben (Menotti-Raymond et al., 1998).

Bei Mikrosatelliten handelt es sich um DNS Bereiche, in denen sich Dinukleotide, sogenannte TG oder CA Repeats, ca. 10 bis 60 mal wiederholen. Mikrosatelliten unterscheiden sich ausschließlich in der Zahl der Wiederholungen dieser Einheiten.

Da sich Mikrosatelliten zahlreich über das komplette Genom verteilen, im menschlichen Genom kommen ca. 10^5 TG Mikrosatelliten vor, eignen sich diese besonders gut als Marker.

Eine Besonderheit der Dinukleotidwiederholungen sind die sogenannten „Schattenbanden“ oder „Stotterbanden“, welche die spätere Beurteilung und Auswertung erschweren.

Diese entstehen, weil aufgrund der repetitiven Sequenzen die Polymerase während der PCR auf dem Matrizenstrang hin und her rutschen kann.

4.5 Elektrophorese von Nukleinsäuren

4.5.1 Prinzip

(Dargestellt anhand Martin, 1996)

Nukleinsäuren sind aufgrund ihrer Phosphatgruppen negativ geladene Moleküle, die in einem elektrischen Feld zur positiven Elektrode wandern. Die Auftrennung der einzelnen Moleküle beruht auf ihrer unterschiedlichen Laufgeschwindigkeit. Diese wiederum ist abhängig von der Größe und Struktur der Moleküle, sowie vom Medium, durch welches sie sich hindurchbewegen. Zudem wandern die Moleküle schneller, je höher die Feldstärke ist. Dividiert man die angelegte Spannung durch die Entfernung der beiden Pole, erhält man die Feldstärke (V/cm). Gele, die in ihrer Wirkung einem Sieb entsprechen, bestehen aus einer von Puffer umschlossenen massiven Matrix, die zahlreiche Poren enthält, durch die die Nukleinsäuren wandern müssen. Kleine Moleküle kollidieren seltener mit der Matrix als große und kommen somit schneller voran.

4.5.2 Agarosegelelektrophorese

Agarose ist ein langkettiges Polysaccharid mit repetitiven Untereinheiten aus D-Galaktose und 3,6-Anhydro-1-Galaktose. Zum Nachweis und zur Untersuchung der Amplikons wurden 2%ige Agarosegele verwendet. Hierzu wurden 1,4 g small DNS Agarose mit 70 ml 0,5 x TBE Puffer unter ständigem Rühren aufgekocht und anschließend auf ca. 50°C abgekühlt. Die noch flüssige Agarose wurde in eine vorbereitete Kammer für horizontale Gele gegossen und nach der Polymerisierung noch eine weitere halbe Stunde im Kühlschrank aufbewahrt.

Die PCR Produkte wurden mit 2 µl Auftragspuffer versetzt und in die vorgesehenen Geltaschen gegeben. Der Auftragspuffer erhöht das spezifische Gewicht der Proben, so dass diese beim Beladen des Geles in die Taschen sinken. Als Laufpuffer wurde 0,5 x TBE Puffer verwendet. Bei einer Spannung von 120 Volt und einem Elektrodenabstand von 19,5 cm und der sich daraus ergebenden Feldstärke von 6,2 V/cm, betrug die Laufdauer 2 h. Anschließend wurden die Banden durch Färbung mit Ethidiumbromid, einem Fluoreszenzfarbstoff der in die DNS interkaliert und UV

Bestrahlung sichtbar gemacht. Die Ergebnisse wurden zur Dokumentation fotografiert.

4.3.3 Polyacrylamidgelelektrophorese

Polyacrylamidgele haben kleinere Poren als Agarosegele, womit eine höhere Auftrennung erreicht wird. In Gegenwart eines doppelendigen Bisacrylamidquervernetzers wird die Polymerisierung kurzer Acrylamidmoleküle durch die Bildung freier Radikale, welche von Ammoniumpersulfat bereit gestellt und durch TEMED stabilisiert werden, katalysiert. So entstehen Ketten von Acrylamidmonomeren, die bisweilen aufgrund des Bisacrylamides quervernetzt sind.

Zur Untersuchung des Mikrosatelliten wurden mit Harnstoff versetzte, denaturierende Polyacrylamidgele verwendet. Die kleinen Harnstoffmoleküle brechen die Wasserstoffbrücken zwischen den Basenpaaren auf und zerstören so die intramolekulare Verbindung. Auf diese Weise erhält man ein hochauflösendes Gel mit dem sich Längenunterschiede von einem Nukleotid der einzelsträngigen DNS Fragmente darstellen lassen.

Zur Herstellung des Polyacrylamidgeles wurden zwei gereinigte Glasplatten mit Ethanol entfettet. Die Behandlung der Bindeplatte erfolgte mit einer Lösung aus 150 µl 10%iger Essigsäure, 20 µl γ-Methacryloxypropyltrimethyloxysilane, die mit 99%igem Ethanol auf 5 ml aufgefüllt wurde. Die Behandlung der Silikonplatte erfolgte mit einer Lösung aus 400 µl Dimethylchlorsilan in 5 ml Chloroform. Beide Platten wurden anschließend je dreimal mit Diethylether und 99%igem Ethanol poliert. Für vertikale Gele wurde das Modell Sequi Gen Cell 38x30 verwendet.

Für ein 5%iges Polyacrylamidgel wurden 10 ml Gelkonzentrat, 5 ml 10 x Pufferkonzentrat und 35 ml 50%iger Harnstoff sowie 400 µl 10%iges Ammoniumpersulfat und 20 µl TEMED angesetzt und zur Polymerisierung in die Kammer gegossen. Als Laufpuffer diente 1 x TBE Puffer. Die mit 4 µl Auftragspuffer versetzten radioaktiv markierten Proben wurden 3 min bei 95°C denaturiert und hiervon jeweils 7 µl umgehend in die gründlich gesäuberten Geltaschen eingebracht. Bei einer Spannung von 600 Volt betrug die Laufzeit 2,5 h. Nach Beendigung des Laufes wurde das Gel zusammen mit der Bindeplatte 1 h in 10%ige Essigsäure gelegt und im Anschluss daran 1 h bei 37°C getrocknet. Die Dokumentation der

Ergebnisse erfolgte mittels Röntgenfilm, der zur optimalen Darstellung der Banden unterschiedlich lange (in der Regel 12 bis 24 h) exponiert wurde. Zum Schluss wurde der Film noch 5 min entwickelt, 10 min fixiert, 20 min gewässert und getrocknet.

4.5.4 Abschätzung der DNS Konzentration

Zur Konzentrationsbestimmung wurde die DNS auf einem 0,8%igen Agarosegel mit Ethidiumbromid angefärbt. Die Konzentration wurde mit Hilfe eines Vergleichsmarkers anhand der Bandenintensität geschätzt. Dafür wurden 1 µl gelöste DNS mit 9 µl H₂O und 2 µl Auftragspuffer versehen und zusammen mit dem Vergleichsmarker auf das Gel geladen.

4.5.5 Isolierung und Reinigung von DNS Fragmenten aus Agarosegelen

Zur Isolierung und Reinigung der DNS Fragmente aus Agarosegelen wurde der Gel Extraction Kit NucleoSpin Extract 2 in 1 eingesetzt. Die zu reinigende DNS wird hierbei, wie im folgenden beschrieben, an die NucleoSpin Silicapartikel gebunden und in mehreren Waschschritten von Verunreinigungen, wie Agarose, Proteinen, Salzen und Ethidiumbromid gereinigt.

Die zu isolierenden DNS Fragmente wurden nach der elektrophoretischen Auftrennung auf einem UV Schirm (366 nm) ausgeschnitten, abgewogen und in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Es wurden 3 Volumen NT1 Puffer zugegeben und anschließend bei 50°C für 10 min inkubiert, wobei die Probe alle 2 min durch Vortexen gemischt wurde. Nach dem Laden der NucleoSpin Tube mit der Probe wurde 60 s bei 6000 x g in der Tischzentrifuge zentrifugiert. Hieran schließt sich ein zweimaliger Waschschriff mit jeweils 700 µl des NT3 Waschpuffers an. Um eventuell noch vorhandenes Ethanol zu entfernen, wurde nochmals bei 6000 x g für 60 s zentrifugiert.

Mit 50 µl NE Elutionspuffer konnte die Probe dann gereinigt wieder gewonnen werden.

4.6 Analyse der Amplikons mit Restriktionsendonucleasen

4.6.1 Prinzip

Gereinigte Restriktionsendonucleasen ermöglichen es, DNS Moleküle präzise und sequenzspezifisch zu schneiden. Enzyme der Klasse II erkennen eine kurze spezifische Sequenz auf der DNS und hydrolisieren die DNS innerhalb dieser Sequenz.

Enzyme, die gerade Enden (*blunt ends*) erzeugen schneiden die Zucker-Phosphat-Kette zwischen 5' und 3' Ende. Enzyme, die überstehende kohäsive Enden (*sticky ends*) erzeugen schneiden die Zucker-Phosphat-Kette schräg von 5' zu 5' Ende oder schräg von 3' zu 3' Ende.

Eine Einheit eines Enzymes ist definiert als die Menge, die 1 µg DNS in einer Stunde spaltet.

4.6.2 Durchführung

DNS Proben wurden im Anschluß an die *seminested* PCR, mit den Primern PKDDOG1, PKDDOG2 und PKDDOG3 zum einen mit dem Enzym Bsh1236I (Fnu D II) und zum anderen mit dem Enzym Hinf I geschnitten. Für den Reaktionsansatz wurden jeweils 1 µl Enzym, 2 µl des mitgelieferten Puffers, 5 µl des PCR Produktes und 13 µl Wasser bidest. zusammen pipettiert. Nach einer Inkubationszeit von 4 h bei 37°C konnte das Ergebnis mit Hilfe eines DNS Agarosegels dargestellt werden.

4.7 DNS Klonierung

4.7.1 Prinzip

Die Klonierung ist eine Methode zur Vervielfältigung und Reinigung von rekombinierten Molekülen.

Der Ablauf setzt sich aus folgenden Schritten zusammen:

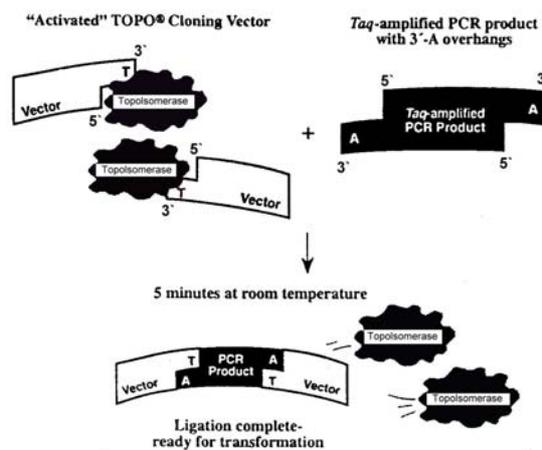
1. Herstellung eines rekombinierten DNS Moleküls
2. Transformation
3. Vervielfältigung
4. Selektion und Isolation des entsprechenden Klones

4.7.1.1 Herstellung eines rekombinierten DNS Moleküls

Im ersten Schritt wird mit Hilfe von Enzymen ein DNS Fragment in ein Vektormolekül eingebaut. Vektoren sind Plasmide, Phagen oder Cosmide. Sie stellen die Replikationsfunktion zur Verfügung, die eine Vervielfältigung des DNS Fragmentes in einer Wirtszelle ermöglicht. Plasmide ermöglichen die Klonierung von DNS Stücken in einer Größe von bis zu 8 kb, zudem besitzen sie weitere individuelle Eigenschaften, die unter anderem die Identifizierung der rekombinanten Moleküle erlaubt.

Bei dem in dieser Arbeit verwendeter Kit liegt der Vektor bereits linearisiert vor. Die jeweiligen Enden haben einen, aus einem einzelnen 3' Deoxythymidin bestehenden Überhang, an dem die Topoisomerase kovalent gebunden ist. Die bei der PCR verwendete Taq Polymerase hat eine vom *Template* unabhängige terminale Transferase Aktivität, welche ein einzelnes Deoxyadenosin an das 3' Ende des PCR Produktes anhängt. Auf diesem Weg kann das PCR Produkt sehr schnell und effektiv eingebaut werden.

Abb.15: Einbau des PCR Produkt in den pCR[®] 2.1 TOPO Vektor



Der Plasmidvektor pCR[®]2.1-TOPO[®] liegt bereits linearisiert vor. Die Enden haben einen Überhang, an dem die Topoisomerase kovalent gebunden ist. Die PCR Produkte der Taq Polymerase besitzen ein einzelnes Deoxyadenosin am 3' Ende. Auf diesem Weg kann das PCR Produkt sehr schnell und effektiv eingebaut werden.

Quelle: modifiziert nach dem Protokoll der Firma Invitrogen[®], TOPO TA Cloning[®] Kit

4.7.1.2 Transformation

Bei der Transformation handelt es sich um die Aufnahme des Vektors in eine Wirtszelle, in der Regel E.coli. Zu diesem Zweck unterzieht man die Wirtszellen, die anschließend als kompetent bezeichnet werden, einer physikalisch oder chemischen Behandlung, welche die Effizienz der Vektoraufnahme steigert. Durch einen Hitzeschock kommt es zur eigentlichen Aufnahme der DNS in die kompetenten Zellen. Die Transformation ist ein ineffektiver Vorgang, bei dem nur 0,1% aller zur Verfügung stehenden Moleküle in eine Zelle aufgenommen werden.

Um im Anschluß Zellen, die ein Plasmid aufgenommen haben, von den anderen unterscheiden zu können, bedient man sich eines selektierbaren Markers. Hierbei handelt es sich um ein im Plasmid befindliches Gen, welches der Wirtszelle eine neue Eigenschaft, z. B. eine Ampizillinresistenz, verleiht. Setzt man zur Vermehrung nun ein ampizillinhaltiges Nährmedium ein, können nur transformierte Zellen wachsen.

4.7.1.3 Vervielfältigung

Zum einen entstehen in der Zelle selbst zahlreiche identische Kopien des Plasmids und zum anderen wird das Plasmid bei der Zellteilung an die Tochterzellen weitergegeben.

4.7.1.4 Selektion und Isolation des entsprechenden Klonen

Um Kolonien mit rekombinanten Plasmiden zu identifizieren, macht man sich die sogenannte LacZ Selektion zunutze. Das verwendete Plasmid enthält ein Gen namens *lacZ'*, welches für die Synthese der β -Galaktosidase verantwortlich ist. Ein Laktoseanalog namens X-gal (5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galctopyranosid) wird von der β -Galactosidase, ein Enzym welches normalerweise Laktose zu Glukose und Galaktose spaltet, zu einem blauen Reaktionsprodukt abgebaut. Beim Einbau des DNS Fragment wird der Leserahmen dieses Gens unterbrochen, so dass die entsprechenden Zellen nicht in der Lage sind, β -Galaktosidase zu synthetisieren. Kolonien, die keine rekombinanten Plasmide enthalten, erkennt man an der blauen Farbe.

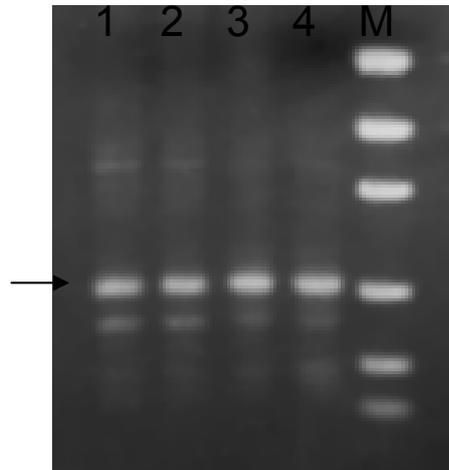
Ausgewählte Bakterienkolonien werden in einem Flüssigmedium vermehrt und die Plasmide mit Hilfe der Plasmid Mini DNS Präparation isoliert.

Durch Restriktionsanalyse können die isolierten Plasmide überprüft werden.

4.7.2 Durchführung

Als Ausgangsmaterial für die PCR diente die aus Blut extrahierte DNS einer PKD positiv und einer PKD negativ geschallten Katze. Das mit Hilfe der Primer PKDDOG1 und PKDDOG2 gewonnene PCR Produkt wurde elektrophoretisch aufgetrennt und die entsprechenden Banden aus dem Gel gereinigt.

Abb.16: PCR Produkt der Primer PKDDOG1 und PKDDOG2



Das mit den Primer PKDDOG1 und PKDDOG2 gewonnene PCR Produkt wurde in einem 2%igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Nach der Reinigung der Banden aus dem Gel dienten diese Proben als Ausgangsmaterial für die Klonierungsreaktion. In den Reihen eins und zwei befinden sich Proben von PKD negativ, in den Reihen drei und vier Proben von PKD positiv geschallten Katzen. Mit M bezeichnet ist der Low Range Massenmarker. Der Pfeil kennzeichnet das spezifische PCR Produkt.

Diese Proben wurden mit dem TOPO TA Cloning[®] Kit entsprechend dem Protokoll kloniert. Als Wirtszellen dienten TOP10 One Shot[™] Bakterienzellen.

Die Selektion fand auf vorgewärmten, mit 40 µl IPTG (25 ng/ml) und 40 µl X-Gal (40 µg/ml) bestrichenen LB (Luria-Bertani) Agar Kulturplatten statt. Die Platten wurden hierfür über Nacht bei 37°C inkubiert.

Ausgewählte Kolonien wurden in 3 ml, mit Ampicillin versetztem LB Medium überimpft und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Zur Konservierung wurden je 850 µl der Ausgangskulturen mit 150 µl Glycerin versetzt und bei -70°C eingefroren.

Jeweils 1,5 ml der Kulturen dienten als Ausgangsmaterial für die Plasmid Mini DNS Präparation.

Hierfür wurden die Proben 20 s zentrifugiert und der Überstand verworfen. Es folgte die Resuspendierung der Zellen in 100 µl Lösung I und nach einer Inkubation von 5 min die Zugabe von 20 µl Lösung II. Nach einer weiteren Inkubation von 5 min auf Eis wurden 150 µl vorgekühlter Lösung III zupipettiert. Mittels Inversion lies sich die Probe vorsichtig mischen.

Nach einer erneuten Inkubation von 5 min wurde 5 min zentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

Durch Zugabe von 2 Volumen Ethanol konnte die Probe gefällt werden.

Nach zweimaligen Waschen mit 70%igen Ethanol wurde das Präzipitat in 20 µl 1xTE Puffer gelöst und zur Aufbewahrung eingefroren.

Zur Überprüfung wurden jeweils 3 µl der Proben aus der Plasmid Mini DNS Präparation mit 2 µl Ladepuffer versetzt und auf einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt. Anhand des Geles wurden die stärksten Proben für den Verdau mit dem Restriktionsenzym Hind III ausgewählt.

6 µl der Proben wurden jeweils mit 1 µl Hind III, 2 µl Enzympuffer und 11 µl H₂O bidest für 2 h bei 37°C im Wasserbad inkubiert.

Durch Auftrennung in einem 1%igen Agarosegel konnten positive Klone identifiziert und für die weitere Analyse ausgewählt werden.

Je 10 ml LB Flüssigmedium wurden mit den zuvor eingefrorenen Stocks, der ausgewählten Klone angeimpft und über Nacht bei 37°C inkubiert.

3 ml der Suspension dienten als Ausgangsmaterial für die, mit Hilfe des Nucleobond[®] AX Kits durchgeführten Plasmidisolierung. Zum Einsatz kamen die Nucleobond[®] AX20 Säulen. Abweichend von dem vorgegebenen Protokoll wurden jeweils 0,6 ml anstatt der angegebenen 0,4 ml der im Kit enthaltenen Puffer S1, S2 und S3 verwendet. Mit den höheren Puffervolumina konnte ein quantitativ besseres Ergebnis erzielt werden. Von den in 20 µl 1 x TE Puffer gelösten Proben wurde die DNS Konzentration photometrisch bestimmt. Die Sequenzierung der Proben wurde von der Firma GATC GmbH, Konstanz durchgeführt.

5 Ergebnisse

5.1 Beschreibung der Stichprobe

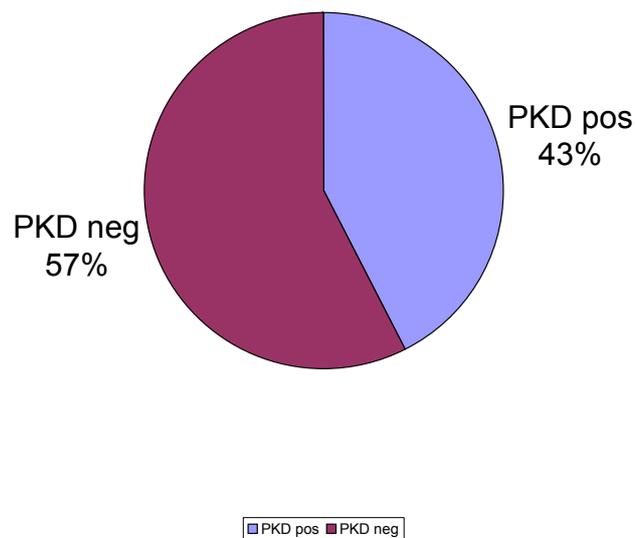
Mit Microsoft Excel wurde eine Datenbank angelegt, um die Familienverhältnisse zu ermitteln und um die vielfältigen Informationen zu verarbeiten.

In die Datenbank wurde jedes Tier als eigenes Individuum mit allen vorhandenen Informationen aufgenommen. Dies bedeutet, dass auch die in den Abstammungsnachweisen aufgeführten Vorfahren als eigener Datensatz in die Tabelle eingegeben wurden. Die zugehörigen Datenfelder beinhalteten Name des Tieres, Zuchtbuchnummer des Tieres, Geburtsdatum, Geschlecht, PKD Status, Vater des Tieres, Zuchtbuchnummer des Vaters, Mutter des Tieres sowie Zuchtbuchnummer der Mutter. Fehlende Informationen wurden mit 0 für unbekannt gekennzeichnet. Für die Auswertungen wurden immer nur die Individuen verwendet, bei welchen für die entsprechende Fragestellung die Informationen vorhanden waren.

Gesamtzahl der Tiere in der Datei	1974
Anzahl der Tiere mit bekanntem PKD Status	334
Anzahl der Tiere mit vorhandener Blutprobe	175
Anzahl der Tiere mit Status PKD negativ	192
davon männlich	59
davon weiblich	125
davon unbekannt	8
Anzahl der Tiere mit Status PKD positiv	142
davon männlich	56
davon weiblich	75
davon unbekannt	11

In der vorliegenden Stichprobe war bei 334 Tieren das Ergebnis der Ultraschalluntersuchung auf das Polyzystische Syndrom bekannt. Bei 57% der untersuchten Tiere fiel das Ergebnis negativ und bei 43% der Tiere positiv aus.

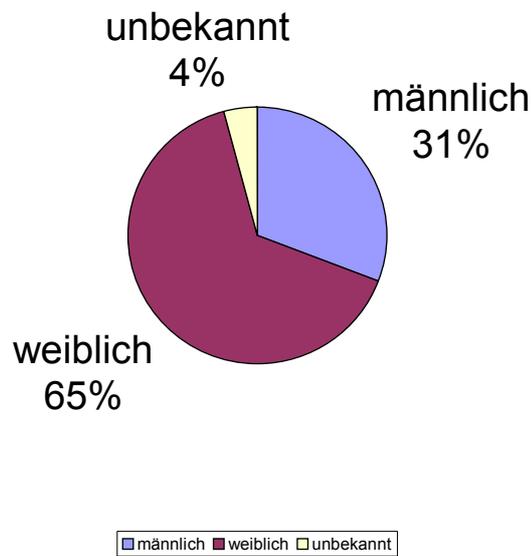
Abb.17: PKD Status in der vorliegenden Stichprobe



In der von angelegten Datenbank war der PKD Status bei 334 Tieren aus der Ultraschalluntersuchung bekannt. Das Ergebnis dieser Untersuchung war bei 57% der Tiere PKD negativ und bei 43% der Tiere PKD positiv.

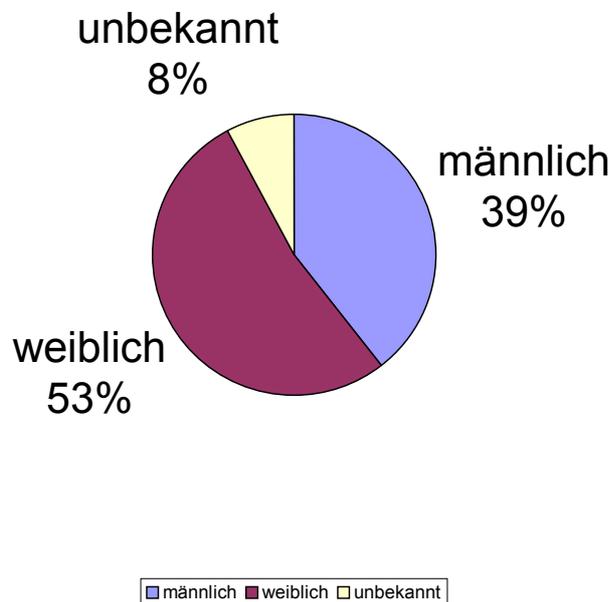
Zusätzlich wurden die beiden Teilstichproben, die sich durch Aufteilung in PKD positive und PKD negative Tiere ergaben hinsichtlich ihrer Geschlechtsverteilung überprüft. Bei der Betrachtung der PKD negativen Tiere stellten sich 65% der Stichprobe als weiblich und 31% als männlich heraus. Bei der Betrachtung der PKD positiven Tiere waren sich 53% der Tiere weiblich und 39% der Tiere männlich. Weiterhin wurde die Gruppe der männlichen und der weiblichen Tiere einzeln hinsichtlich ihres PKD Status überprüft. In der Gruppe der männlichen Tiere handelte es sich in 49% der Fälle um PKD positive Tiere und in 51% der Fälle um PKD negative Tiere. In der Gruppe der weiblichen Tiere handelte es sich in 38% der Fälle um PKD positive Tiere und in 62% der Fälle um PKD negative Tiere.

Abb.18: Geschlechtsverteilung bei den PKD negativen Tieren



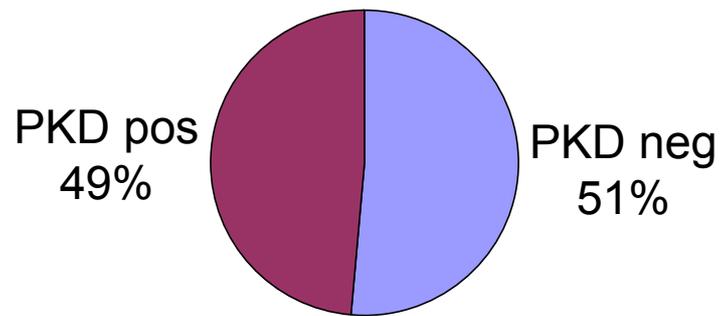
Von den 192 PKD negativen Tieren waren 31% der Tiere männlich und 65% der Tiere weiblich. Bei 4% der Tieren war das Geschlecht unbekannt.

Abb.19: Geschlechtsverteilung bei den PKD positiven Tiere



Von den 142 PKD positiven Tieren waren 39% der Tiere männlich und 53% der Tiere weiblich. Bei 8% der Tiere war das Geschlecht unbekannt.

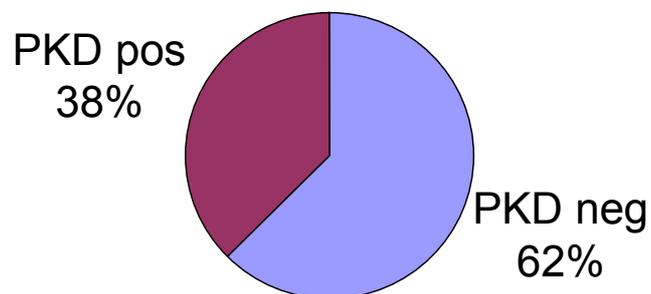
Abb.20: PKD Status der männlichen Tiere



■ PKD neg ■ PKD pos

Von den Insgesamt 115 männlich Tiere mit bekannten PKD Status in der Datenbank waren 51% der Tiere PKD negativ und 49% Tiere PKD positiv.

Abb.21: PKD Status der weiblichen Tiere



■ PKD neg ■ PKD pos

Von den Insgesamt 200 weiblichen Tiere mit bekannten PKD Status in der Datenbank waren 62% der Tiere PKD negativ und 38% der Tiere PKD positiv.

5.2 Der Vererbungsmodus des Polyzystischen Syndroms

Um anhand des vorhandenen Datenmaterials den möglichen Erbgang zu überprüfen wurden folgende Hypothesen aufgestellt:

Hypothese 1: der Vererbungsmodus für PKD ist autosomal rezessiv,

Hypothese 2: der Vererbungsmodus für PKD ist autosomal dominant und

Hypothese 3: der Vererbungsmodus für PKD ist autosomal dominant
und Homozygotie für das Krankheitsgen ist letal.

5.2.1 Hypothese 1: Der Vererbungsmodus für PKD ist autosomal rezessiv

Wenn es sich um einen autosomal rezessiven Erbgang handelt, muß der Genotyp bei allen PKD positiven, also kranken Tieren homozygot sein. Bei PKD negativen, also gesunden Tieren, kann der Genotyp sowohl heterozygot wie auch homozygot sein.

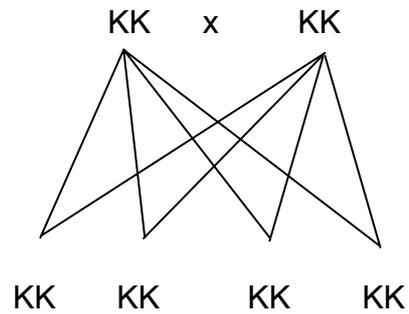
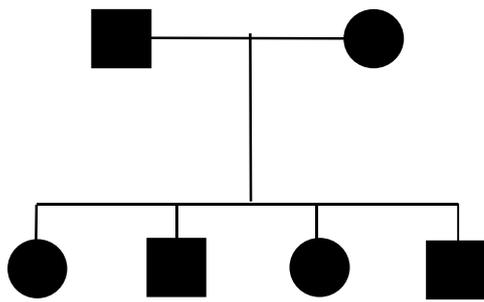
Tabelle 3: Genotypen bei einem rezessiven Erbgang

Phänotyp	PKD positiv	PKD negativ	PKD negativ
Genotyp	KK	KG	GG

Bei einem rezessiven Erbgang können PKD negative Tiere den homozygoten Genotyp GG oder den heterozygoten Genotyp KG tragen. PKD positive Tiere besitzen immer den homozygoten Genotyp KK.

So ist es bei einem rezessiven Vererbungsmodus nicht möglich, dass aus der Paarung von zwei kranken Elterntieren gesunde Nachkommen hervorgehen.

Abb.22: Nachkommen von kranken Elterntieren bei einem rezessiven Erbgang



● = Phänotyp krank, weiblich

KK = Homozygot rezessiv

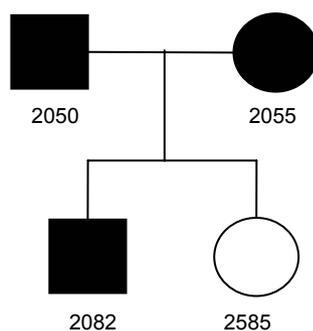
■ = Phänotyp krank, männlich

KK = Homozygot rezessiv

Bei einem angenommenen autosomal rezessiven Erbgang kann aus der Paarung von zwei PKD positiven Elterntieren in der F1 Generation kein PKD negatives Tier hervorgehen.

Bei der Überprüfung des vorhandenen Datenmaterials fiel eine Familie auf, bei welcher zwei PKD positive Eltern ein PKD negatives Nachkommen haben (s. Abb.23), was unter der Annahme eines rezessiven Erbgangs nicht möglich wäre.

Abb.23: Stammbaum einer in der Datenbank vorhandenen Familie



weiblich, PKD positiv ●

männlich, PKD positiv ■

weiblich, PKD negativ ○

weiblich, PKD negativ □

Bei diesem Stammbaum haben zwei, für das Polyzystische Syndrom positive Elterntiere einen gesunden und einen kranken Nachkommen. Unter der Annahme das es sich beim Polyzystischen Syndrom um einen rezessiven Erbgang handelt wäre diese Beobachtung nicht möglich. Bei den angegebenen Zahlen (2050,2055,2082,2585) handelt es sich um die, den einzelnen Individuen zugewiesenen Kennnummern.

Hingegen ist es für einen rezessiven Vererbungsmodus typisch das aus der Paarung von zwei phänotypisch gesunden Tieren kranke Nachkommen hervorgehen, da phänotypisch gesunde Tiere heterozygot sein können. Bei der Paarung von zwei heterozygoten Tieren wäre mit 50% kranker Nachkommen zu rechnen. Bei der Überprüfung des zur Verfügung stehenden Materials konnte jedoch kein Fall beobachtet werden, bei dem zwei PKD negative Tiere einen positiven Nachkommen haben (N = 5).

Für eine weitere Überprüfung der Hypothese 1: der Vererbungsmodus für PKD ist autosomal rezessiv wurden einzelne Paarungstypen und deren Nachkommen ermittelt.

Die folgende Auflistung (s. Tabelle 4) gibt an wie oft die verschiedenen Paarungstypen mit kranken bzw. gesunden Nachkommen in den vorliegenden Daten gefunden wurden. So kam z.B. die Paarung zweier kranker Elterntiere die zu einem kranken Nachkommen führte 15 mal vor.

Tabelle 4: Anzahl Paarungstypen mit kranken bzw. gesunden Nachkommen

Paarungstyp	Nachkomme	Anzahl Beobachtet
K x K	K	15
K x G	K	16
G x K	K	2
G x G	K	0
K x K	G	1
K x G	G	22
G x K	G	3
G x G	G	5

Diese Tabelle gibt an, wie oft die verschiedenen Paarungstypen mit kranken bzw. gesunden Nachkommen in den vorliegenden Daten gefunden wurden. Mit K werden phänotypisch kranke Tiere und mit G phänotypisch gesunde Tiere bezeichnet. Grundlage für die Zuordnung war das Ergebnis der Ultraschalluntersuchung.

Insgesamt handelt es sich bei 64 (N) Nachkommen um 31 (G) gesunde und 33 (K) kranke Tiere.

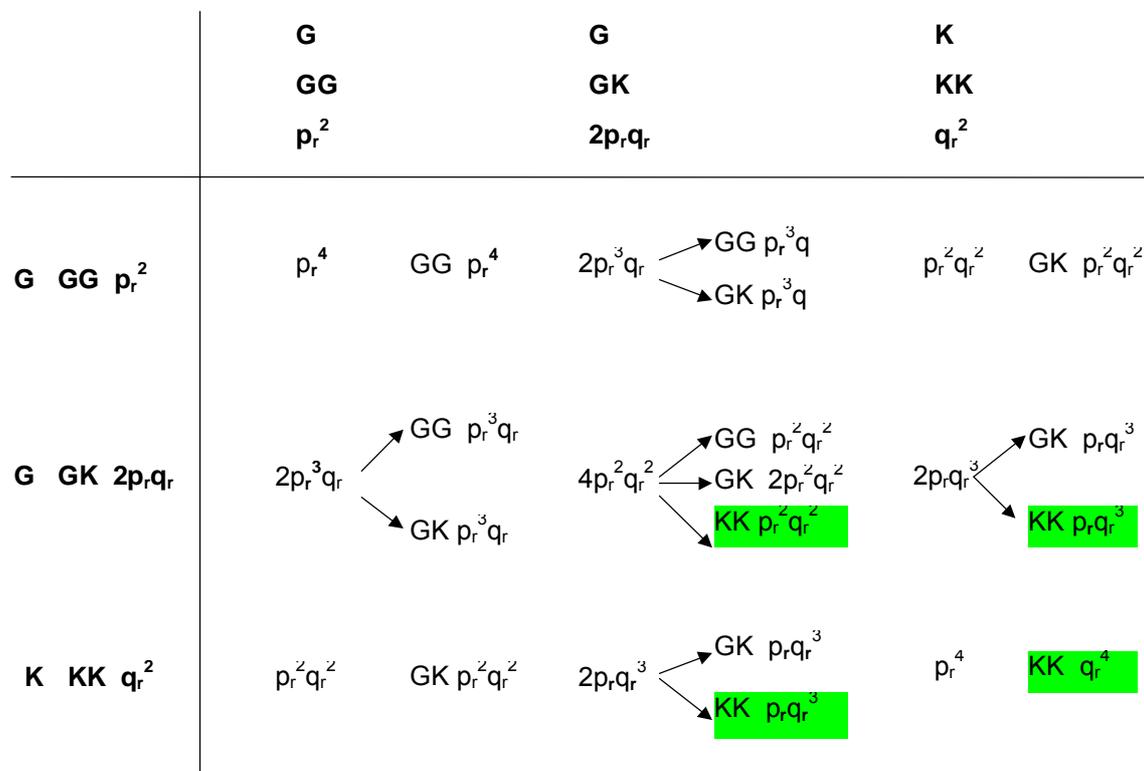
Die Allelfrequenz (f) bei einem angenommenen rezessiven Erbgang ist dann, da alle Kranken in diesem Fall homozygot sein müssen:

$$f(K) = q_r = \sqrt{K / N} = 0,72$$

$$f(G) = p_r = 1 - q_r = 0,28$$

wobei N = Anzahl der Nachkommen, $f(K) = q_r$ = Frequenz des Allels K unter der Annahme eines rezessiven Erbganges, $f(G) = p_r$ = Frequenz des Allels G unter der Annahme eines rezessiven Erbganges

Abb.24: Genotypfrequenzen kranker Nachkommen bei rezessivem Erbgang



Dieses Schema verdeutlicht aus welchen Paarungskombinationen kranke Nachkommen bei einem rezessiven Erbgang hervorgehen können. Oberhalb und links des Schemas stehen die jeweiligen Phäno- und Genotypen sowie die Genotypfrequenzen der Elterntiere. Die Phänotypen sind mit G für gesund und K für krank bezeichnet. Aus den Paarungsmöglichkeiten der Elterntiere ergeben sich die Frequenzen der jeweiligen F1 Generation und deren Genotypfrequenzen. Unterlegt sind die Genotypen und die Genotypfrequenzen kranker Nachkommen bei einem rezessiven Erbgang.

Über die Allelfrequenzen lassen sich die Genotypfrequenzen ermitteln und somit auch die Erwartungswerte bestimmen.

Zu beachten ist hierbei, dass nur die Erwartungswerte für die kranken Nachkommen der verschiedenen Paarungstypen ermittelt werden.

Bei einem rezessiven Erbgang kann ein phänotypisch gesundes Tier (G) genotypisch homozygot (GG) oder heterozygot (GK) sein. Ein phänotypisch krankes Tier hingegen trägt immer den homozygoten Genotyp (KK). Aus der Abbildung 24 geht hervor, dass es sich nur bei den grau unterlegten Nachkommen um kranke Tiere mit dem Genotyp KK handelt.

Die Frequenz aller kranker Nachkommen bei einem rezessiven Erbgang ist demnach:

$$p_r^2 q_r^2 + p_r q_r^3 + p_r q_r^3 + q_r^4 = q_r^2 (p_r^2 + 2p_r q_r + q_r^2) = q_r^2$$

Dies teilt sich auf in

krankte Nachkommen aus dem Paarungstyp Gesund (G) x Gesund (G)

$$G \times G = p_r^2 q_r^2$$

krankte Nachkommen aus dem Paarungstyp Gesund (G) x Krank (K)

$$G \times K = p_r q_r^3 + p_r q_r^3 = 2p_r q_r^3$$

und krankte Nachkommen aus dem Paarungstyp Krank (K) x Krank (K)

$$K \times K = q_r^4$$

Diese Frequenzen müssen auf den Anteil kranker beobachteter Tiere bezogen werden und nicht auf die Gesamtzahl der Stichprobe, da für die Fragestellung nur diese von Bedeutung sind.

Somit ergibt sich folgende Erwartungswerte für den Anteil kranker Nachkommen aus

$$G \times G = p_r^2 q_r^2 / q_r^2 = 0,0784$$

$$G \times K = p_r q_r^3 + p_r q_r^3 / q_r^2 = 2p_r q_r^3 / q_r^2 = 0,4032$$

$$K \times K = q_r^4 / q_r^2 = 0,5184$$

Tabelle 5: Zusammenfassung der Beobachtungs- und Erwartungswerte unter der Annahme eines rezessiven Erbgangs

Paarungstyp	Beobachtet	Erwartet	Beobachtet	Erwartet
Eltern	%	%	absolut	absolut
G x G	0	7,84	0	2,59
G x K	55	40,32	18	13,31
K x K	45	51,84	15	17,11

Für die verschiedenen Paarungstypen sind die beobachteten und erwarteten, prozentuellen und absoluten Werte der aus den jeweiligen Paarungstypen hervorgehenden kranker Nachkommen aufgelistet. Mit K werden phänotypisch kranke Tiere und mit G phänotypisch gesunde Tiere bezeichnet.

Die Überprüfung mit dem Chi Quadrat Test ergibt eine χ^2 Wert von 4,5

Die Hypothese 1: Der Vererbungsmodus für das Polyzystische Syndrom ist autosomal rezessiv kann abgelehnt werden.

5.2.2 Hypothese 2: der Vererbungsmodus für PKD ist autosomal dominant

Wenn es sich um einen autosomal dominanten Erbgang handelt, muß der Genotyp bei allen PKD negativen, also gesunden Tieren homozygot sein. Bei PKD positiven, also kranken Tieren, kann der Genotyp sowohl heterozygot wie auch homozygot sein.

Tabelle 6: Genotypen bei einem dominanten Erbgang

Phänotyp	PKD negativ	PKD positiv	PKD positiv
Genotyp	GG	GK	KK

Bei einem dominanten Erbgang können PKD positive Tiere den homozygoten Genotyp KK oder den heterozygoten Genotyp KG tragen. PKD negative Tiere besitzen immer den homozygoten Genotyp GG.

Bei einem angenommenen autosomal dominanten Erbgang kann aus der Paarung von zwei PKD negativen Elterntieren in der F1 Generation kein PKD positives Tier hervorgehen.

Bei der Überprüfung des vorhandenen Datenmaterial konnte kein gegenteiliges Beispiel ausgemacht werden.

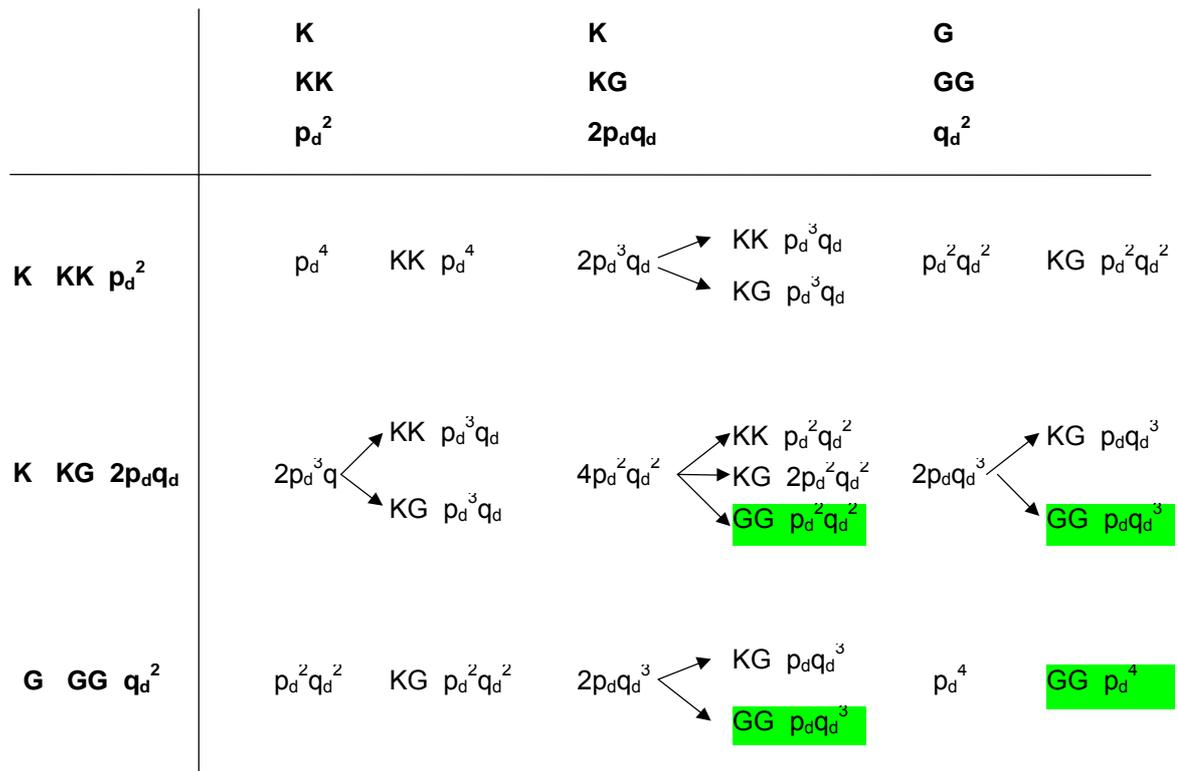
Bei der Annahme alle PKD negativen Tiere seien homozygot (GG) berechnet sich die Allelfrequenz für G wie folgt:

$$f(G) = q_d = \sqrt{G / N} = 0,7$$

$$f(K) = p_d = 1 - p_d = 0,3$$

wobei N = Anzahl der Nachkommen, $f(K) = p_d$ = Frequenz des Allels K unter der Annahme eines dominanten Erbganges, $f(G) = q_d$ = Frequenz des Allels G unter der Annahme eines dominanten Erbganges

Abb.25: Genotypfrequenzen gesunder Nachkommen bei dominantem Erbgang



Dieses Schema verdeutlicht aus welchen Paarungskombinationen gesunde Nachkommen bei einem dominanten Erbgang hervorgehen können. Oberhalb und links des Schemas stehen die jeweiligen Phäno- und Genotypen sowie die Genotypfrequenzen der Elterntiere. Die Phänotypen sind mit G für gesund und K für krank bezeichnet. Aus den Paarungsmöglichkeiten der Elterntiere ergeben sich die Frequenzen der jeweiligen F1 Generation und deren Genotypfrequenzen. Unterlegt sind die Genotypen und die Genotypfrequenzen gesunder Nachkommen bei einem dominanten Erbgang.

Bei einem dominanten Erbgang kann ein phänotypisch krankes Tier (K) genotypisch homozygot (KK) oder heterozygot (KG) sein. Ein phänotypisch gesundes Tier hingegen trägt immer den homozygoten Genotyp (GG). Aus der Abbildung 25 geht hervor, dass es sich nur bei den grün unterlegten Nachkommen um gesunde Tiere mit dem Genotyp GG handelt.

Die Frequenz aller kranker Nachkommen bei einem rezessiven Erbgang entspricht der Frequenz aller gesunden Nachkommen bei einem dominanten Erbgang.

Demnach ist die Frequenz aller kranker Nachkommen bei einem dominanten Erbgang: $1 - q_d^2$

Dies teilt sich auf in

krankte Nachkommen aus dem Paarungstyp Krank (K) x Krank (K)

$$K \times K = q_d^4 + 2p_d^3q_d + 2p_d^3q_d + p_d^2q_d^2 + 2p_d^2q_d^2 = p_d^2(1 + 2q_d)$$

und kranke Nachkommen aus dem Paarungstyp Gesund (G) x Krank (K)

$$G \times K = p_d^2q_d^2 + p_dq_d^3 + p_d^2q_d^2 + p_dq_d^3 = 2p_d^2q_d^2 + 2p_dq_d^3 = 2p_dq_d^2$$

Aus dem Paarungstyp Gesund (G) x Gesund (G) können keine kranke Nachkommen hervorgehen

$$G \times G = 0$$

Diese Frequenzen müssen wiederum auf den Anteil kranker beobachteter Tiere bezogen werden und nicht auf die Gesamtzahl der Stichprobe, da für die Fragestellung nur diese von Bedeutung sind.

Somit ergibt sich folgende Erwartungswerte für den Anteil kranker Nachkommen aus

$$K \times K = p_d^2(1 + 2q_d) / 1 - q_d^2 = 0,42$$

$$G \times K = 2p_dq_d^2 / 1 - q_d^2 = 0,58$$

$$G \times G = 0$$

Tabelle 7: Zusammenfassung der Beobachtungs- und Erwartungswerte unter der Annahme eines dominanten Erbgangs

Paarungstyp	Beobachtet	Erwartet	Beobachtet	Erwartet
Eltern	%	%	absolut	absolut
G x G	0	0	0	0
G x K	55	58	18	19,1
K x K	45	42	15	13,9

Für die verschiedenen Paarungstypen sind die beobachteten und erwarteten, prozentuellen und absoluten Werte der aus den jeweiligen Paarungstypen hervorgehenden kranken Nachkommen aufgelistet. Mit K werden phänotypisch kranke Tiere und mit G phänotypisch gesunde Tiere bezeichnet.

Die Überprüfung mit dem Chi Quadrat Test ergibt einen χ^2 Wert von 0,15

Die Hypothese 2: Der Vererbungsmodus für das Polyzystische Syndrom ist autosomal dominant kann nicht abgelehnt werden.

5.2.3 Hypothese 3: der Vererbungsmodus für PKD ist autosomal dominant und Homozygotie für das Krankheitsgen ist letal

Da homozygote kranke Tiere nicht vorkommen entspricht die Anzahl der kranken Tiere der Anzahl der Heterozygoten.

Tabelle 8: Genotypen bei einem dominanten Erbgang und zusätzlicher Letalität bei Homozygotie des Krankheitsgenortes

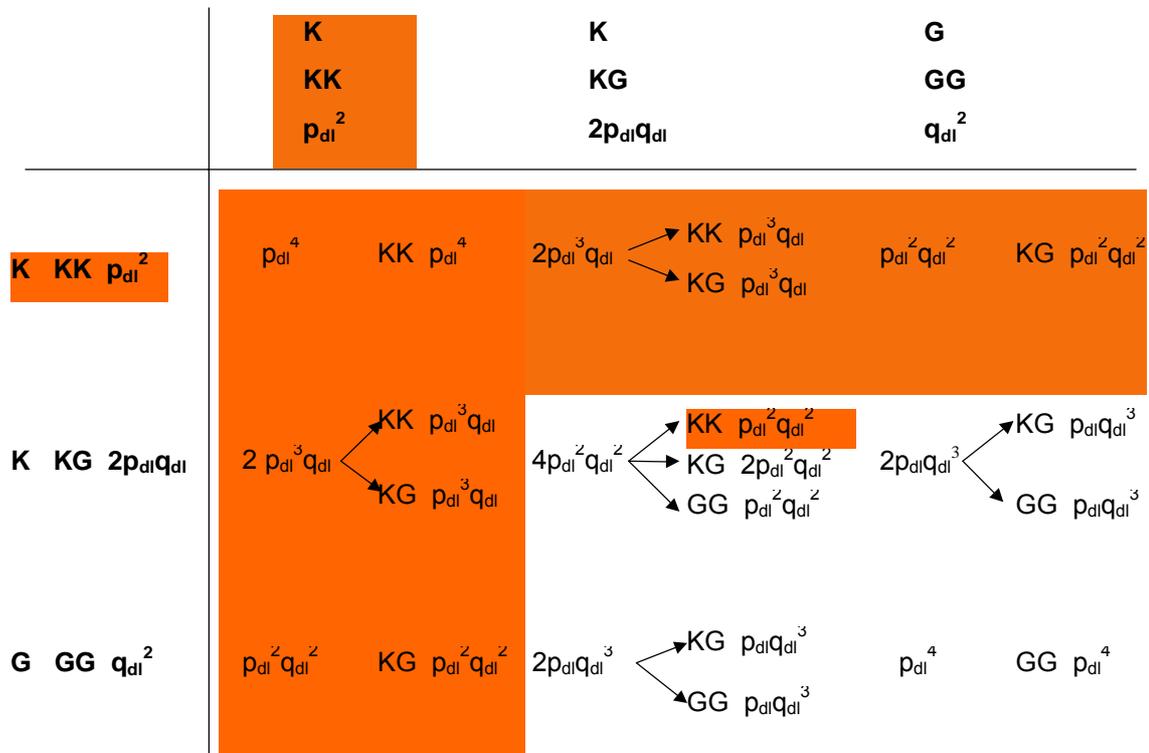
Phänotyp	PKD negativ	PKD positiv	Letal
Genotyp	GG	GK	KK

Bei einem dominanten Erbgang und zusätzlicher Letalität bei Homozygotie des Krankheitsgenortes können PKD positive Tiere nur den heterozygoten Genotyp GK tragen. PKD negative Tiere besitzen zudem immer den homozygoten Genotyp GG.

Wenn Homozygotie des Krankheitsgen (KK) letal ist können auch Paarungskombinationen an denen diese Tiere beteiligt wären und die daraus resultierenden Nachkommen nicht existieren (s. Abb. 26). Da das Hardy-Weinberg Gesetz nur für Populationen gilt die sich im Gleichgewicht befinden gilt, kann es für diesen Fall nicht angewendet werden. Bei einer Letalität des homozygoten Trägers des Krankheitsgen findet eine Selektion gegen das Krankheitsgen (K) statt und somit sind die Genotyp- und Allelfrequenzen von Generation zu Generation nicht mehr konstant.

Die Selektion gegen den Genotyp KK führt zu den in Abbildung 27 dargestellten Nachkommen mit den entsprechenden Genotypfrequenzen.

Abb.26: Die Nachkommen bei dominantem Erbgang und zusätzlicher Letalität bei Homozygotie des Krankheitsgens



Dieses Schema verdeutlicht welche Paarungskombinationen bzw. Nachkommen bei einem dominanten Erbgang und zusätzlicher Letalität bei Homozygotie des Krankheitsgens nicht existieren (unterlegt). Oberhalb und links des Schemas stehen die jeweiligen Phäno- und Genotypen sowie die Genotypfrequenzen der Elterntiere. Die Phänotypen sind mit G für gesund und K für krank bezeichnet. Die aufgeführten Frequenzen der jeweiligen F1 Generation gelten unter der Voraussetzung das sich die Population im Gleichgewicht befindet und dienen hier nur dem Vergleich zu den vorangegangenen Abbildungen 24 und 25.

Aus der Abbildung 27 geht hervor, dass es sich nur bei den grau unterlegten Nachkommen um kranke Tiere mit dem Genotyp KG handelt. Die Frequenz aller kranken Tiere der F1 Generation ist demnach:

$$2p_{dl}^2 + 2p_{dl}(1 - 2p_{dl}) / 1 - p_{dl}^2 = 2p_{dl} / 1 + p_{dl}$$

Dies teilt sich auf in

kranke Nachkommen aus dem Paarungstyp Krank (K) x Krank (K)

$$K \times K = 2p_{dl}^2 / 1 - p_{dl}^2$$

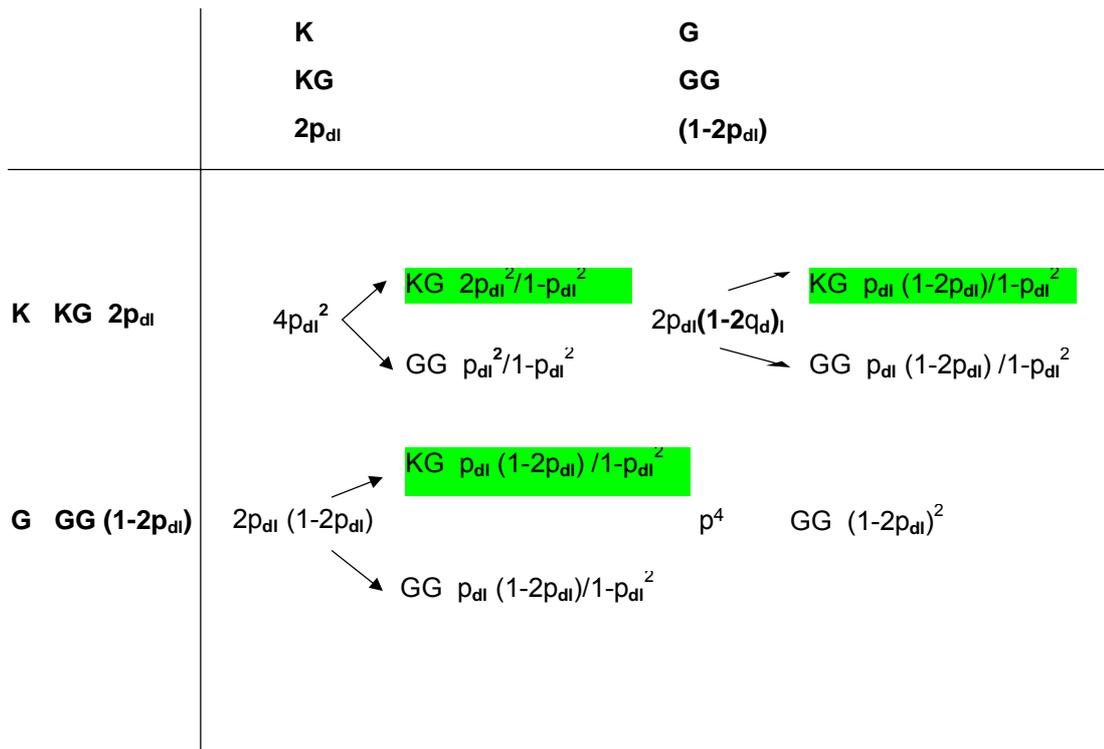
und kranke Nachkommen aus dem Paarungstyp Gesund (G) x Krank (K)

$$G \times K = 2p_{dl}(1 - 2p_{dl}) / 1 - p_{dl}^2$$

Diese Frequenzen müssen wiederum auf den Anteil kranker Tiere bezogen werden, da für die Fragestellung nur diese von Bedeutung sind.

Somit ergibt sich für den Anteil kranker Tiere aus dem Paarungstyp Krank (K) x Krank (K), an allen Kranken: $2p_{dl}^2 \times (1 + p_{dl}) / (1 - p_{dl}^2) \times 2p_{dl} = p_{dl} / 1 - p_{dl}$
 und für den Anteil kranker Tiere aus dem Paarungstyp Gesund (G) x Krank (K), an allen Kranken: $2p_{dl} (1 - 2p_{dl}) \times (1 + p_{dl}) / (1 - p_{dl}^2) \times 2p_{dl} = (1 - 2p_{dl}) / (1 - p_{dl})$

Abb.27: Nachkommen und Genotypfrequenzen bei Selektion gegen den Genotyp KK



Die Selektion gegen den Genotyp KK führt zu den in dieser Abbildung dargestellten Nachkommen mit den entsprechenden Genotypfrequenzen. Oberhalb und links des Schemas stehen die jeweiligen Phäno- und Genotypen sowie die Genotypfrequenzen der Elterntiere. Die Phänotypen sind mit G für gesund und K für krank bezeichnet. Unterlegt sind die Genotypen und die Genotypfrequenzen kranker Nachkommen bei einem dominanten Erbgang und zusätzlicher Letalität des homozygoten Träger des Krankheitsgens (KK).

Für die Schätzung von p_{dl} gilt:

$$f(K) = f(KG) = 2p_{dl} / 1 + p_{dl}$$

$$f(K) = K / N = 33 / 64 = 0,52$$

$$f(K) = 2p_{dl} / 1 + p_{dl}$$

$$f(K) \times (1 + p_{dl}) = 2p_{dl}$$

$$f(K) + f(K) \times p_{dl} = 2p_{dl}$$

$$f(K) = 2p_{dl} - f(K) \times p_{dl}$$

$$f(K) = p_{dl} [2 - f(K)]$$

$$p_{dl} = f(K) / 2 - f(K) = 0,35$$

Der erwartete Anteil kranker Tiere aus dem Paarungstyp Krank (K) x Krank (K), an allen Kranken ist daher $p_{dl} / 1 - p_{dl} = 0,53$

und der erwartete Anteil kranker Tiere aus dem Paarungstyp Gesund (G) x Krank (K), an allen Kranken ist $(1 - 2p_{dl}) / (1 - p_{dl}) = 0,47$

Tabelle 9: Zusammenfassung der Beobachtungs- und Erwartungswerte unter der Annahme eines dominanten Erbgangs und zusätzlicher Letalität bei Homozygotie des Krankheitsgens

Paarungstyp Eltern	Beobachtet %	Erwartet %	Beobachtet absolut	Erwartet absolut
G x G	0	0	0	0
G x K	55	47	18	15,51
K x K	45	53	15	17,49

Für die verschiedenen Paarungstypen sind die beobachteten und erwarteten, prozentuellen und absoluten Werte der aus den jeweiligen Paarungstypen hervorgehenden kranken Nachkommen aufgelistet. Mit K werden phänotypisch kranke Tiere und mit G phänotypisch gesunde Tiere bezeichnet.

Die Überprüfung mit dem Chi Quadrat Test ergibt einen χ^2 Wert von 0,75

Die Hypothese 3: Der Vererbungsmodus für das Polyzystische Syndrom ist autosomal dominant und Homozygotie des Krankheitsgens ist letal kann nicht abgelehnt werden.

5.3 Sequenzanalyse und intragenische Polymorphismen

5.3.1 Sequenz des PKD1 Gens der Katze im Bereich des Introns 41 und flankierender Exonanteile

Mit den Primern PKDDOG1 und PKDDOG2 wurde eine PCR unter den im vorigen Kapitel beschriebenen Bedingungen durchgeführt. Das PCR Produkt aus den DNS Proben einer PKD negativ und einer PKD positiv geschallten Katze wurde im Anschluß kloniert und sequenziert. Die erhaltenen Sequenzen konnte, mit Hilfe der Computersoftware DNASIS, untereinander und mit dem entsprechenden Abschnitt des humanen PKD Genes verglichen werden.

Die erzielte Sequenz hat inklusive der Primer eine Länge von 428 Basenpaaren, wobei die Länge der katzenspezifischen Sequenz 376 Basenpaare beträgt.

Beide Sequenzen untereinander stimmen zu 98,6% überein, so dass davon ausgegangen werden kann das es sich um die gleiche Stelle im Genom handelt. An vier verschiedenen Stellen konnten Polymorphismen (RSP1-RSP4) ausgemacht werden, wovon zwei (RSP2; RSP4) dem Nachweis mit Restriktionsendonukleasen zugänglich waren. Die zwei anderen Polymorphismen (RSP1; RSP3) wurden nicht überprüft, so dass es unklar bleibt ob es sich um einen echten Basenaustausch oder einen eventuelle Sequenzierfehler bzw. einen Fehler der Polymerase handelt.

Abb.28: Teilsequenz des PKD1 Gens der Katze

	PKDDOG 1		PKDDOG3				
	10	20	30	40	50	60	
Katzen1.SEQ	CTACGTGCAGGAGCTGGGCCTGAGCC TGGAAGAGAGCCGCGCGCAGCTGGGCTTCC TGCA						
Katzen2.SEQ	CTACGTGCAGGAGCTGGGCCTGAGCC TGGAAGAGAGCCGCGCGCAGCTGGGCTTCC TGCA						
	10	20	30	40	50	60	
	70	80	90	100	110	120	
Katzen1.SEQ	GCTGCACA ACTGGATCGACAAC AGGTGCTCGCGCTCGGCCTGTCCCCGCCTCTCCGCACT						RSP1
Katzen2.SEQ	GCTGCACA ACTGGATCGACAAT AGGTGCTCGCGCTCGGCCTGTCCCCGCCTCTCCGCACT						
	70	80	90	100	110	120	
	130	140	150	160	170	180	
Katzen1.SEQ	GCGGCGCTTCCGGCGGACACACCGGGGTCCCCACGCGGCCCTCCTCCGGGGCCCTGCCCC						
Katzen2.SEQ	GCGGCGCTTCCGGCGGACACACCGGGGTCCCCACGCGGCCCTCCTCCGGGGCCCTGCCCC						
	130	140	150	160	170	180	
	190	200	210	220	230	240	
Katzen1.SEQ	TCCGCGGTCCACTCCCTCACCCCGCGCTTTTCCGTGTCCCCATCTTTCCCCACGCACCT						
Katzen2.SEQ	TCCGCGGTCCACTCCCTCACCCCGCGCTTTTCCGTGTCCCCATCTTTCCCCACGCACCT						
	190	200	210	220	230	240	
	250	260	270	280	290	300	
Katzen1.SEQ	CACTGACCGCTTAGCCTCCACCTCCTCCCCGGGCCCCGAG G CACCCGCCGCCAAGCCCC						RSP2
Katzen2.SEQ	CACTGACCGCTCAGCCTCCACCTCCTCCCCGGGCCCCGAG A CACCCGCCGCCAAGCCCC						
	250	260	270	280	290	300	
	310	320	330	340	350	360	
Katzen1.SEQ	TTTCTCTGGGAAGACACCCAGTCTTTACCCTGCCCGCCCTCTTCGCCGTG G AGGAGCCG						RSP3
Katzen2.SEQ	TTTCTCTGGGAAGACACCCAGTCTTTACCCTGCCCGCCCTCTTCGCCGTG G AGGAGCCG						
	310	320	330	340	350	360	
	370	380	390	400	410	420	
Katzen1.SEQ	C G CGGTGTTTCGTGGAGCTCACGCGCTACAGCCCAGCCGCGTGGGG CTGCACGCCGCCGTCAC						RSP4
Katzen2.SEQ	C G CGGTGTTTCGTGGAGCTCACGCGCTACAGCCCAGCCGCGTGGGG CTGCACGCCGCCGTCAC						
	370	380	390	400	410	420	
Katzen1.SEQ	GCTGCGCCT		PKDDOG2				
Katzen2.SEQ	GCTGCGCCT						

Die mit den Primern PKDDOG1 und PKDDOG2 amplifizierte katzenspezifische Sequenz hat insgesamt eine Länge von 428 Basenpaaren. Eingezeichnet ist Lage der Primer (PKDDOG1, PKDDOG2, PKDDOG3) und die der vier Polymorphismen (RSP1, RSP2, RSP3, RSP4). Es wurde jeweils DNS einer PKD negativen (Katzen1) und einer PKD positiven Katze (Katzen2) miteinander verglichen, um Polymorphismen aufzuspüren.

Der Vergleich dieser katzenspezifischen Sequenz mit dem entsprechenden Abschnitt des humanen PKD Genes ergab eine Übereinstimmung im Bereich des Exon 41 und 42 von 93,7%.

Abb.29: Vergleich der felines und humanen Sequenz

	10	20	30	40	50	60
Katzen1.SEQ	CTACGTGCAGGAGCTGGGCCTGAGCCTGGAAGAGAGCCGCGCAGCTGGGCTTCCTGCA					
	X::					
PKDHC.SEQ	CTACGTGCAGGAGCTGGGCCTGAGCCTGGAGGAGAGCCGCGACCGGCTGCGCTTCCTGCA					
	11670	11680	11690	11700	11710	11720
	70	80	90	100	110	120
Katzen1.SEQ	GCTGCACAACCTGGATCGACAACAGGTGCTCGCGCTCGGCCTGTCCCCGCCTCTC-CGCAC					
	:::::::::::: : :::::::::: : : :::::: : : : : : : : : : : : : : : : : : :					
PKDHC.SEQ	GCTGCACAACCTGGCTGGACAACAGGAGC-CGCGCT----GTGTTCTTGGAGCTCACGCGC					
	11730	11740	11750	11760	11770	
	130	140	150	160	170	180
Katzen1.SEQ	TGCGGCGCTTCCGGCGGACACACCGGGTCCCCACGCGC-CCTC----CTCCGGGGCCC					
	: :					
PKDHC.SEQ	TACAGCCCGCCGTGGGGCTGCACGCCCGTCACGCTGCGCCTCGAGTTCCCGGCGGCC					
	11780	11790	11800	11810	11820	11830
	290	310	320	330	340	350
Katzen1.SEQ	GCCCTTTCTCTGGAAGACACCCAGTCTTTACCCTGC--CCGCCCTCTCGC---CGTG					
	: :					
PKDHC.SEQ	GAGCCTGGAGGAGAGCCGCGACCGGCTGCGCTTCTTGCAGCTGCACAACCTGGCTGGACAA					
	11690	11700	11710	11720	11730	11740
	360	370	380	390	400	410
Katzen1.SEQ	TAGGAGCCGCGCGTGTTCGTGGAGCTCACGCGCTACAGCCCGCCGTGGGGCTGCACGC					
	X:::::::::::: : :::::: : ::					
PKDHC.SEQ	CAGGAGCCGCGCTGTGTTCTTGGAGCTCACGCGCTACAGCCCGCCGTGGGGCTGCACGC					
	11750	11760	11770	11780	11790	11800
	420					
Katzen1.SEQ	CGCCGTCACGCTGCGCT					
	::::::::::::::::::X					
PKDHC.SEQ	CGCCGTCACGCTGCGCT					
	11810	11820				

Bei der oberen Sequenz (Katzen1) handelt es sich um die katzenspezifische Sequenz, die mit den Primern PKDDOG1 und PKDDOG2 amplifiziert wurde. Die untere Sequenz (PKDHC) ist ein Ausschnitt aus der in der Genbank veröffentlichten Sequenz der humanen ADPKD cDNS. Die Exonabschnitte stimmen zu 93,7% miteinander überein.

Der Vergleich der katzenspezifischen Sequenz mit dem entsprechenden Abschnitt des PKD Genes der Maus ergab eine Übereinstimmung im Bereich des Exon 41 und 42 von 81,7%.

Abb.31: Vergleich der felines Sequenz mit der Sequenz des PKD1 Gen der Maus

```

          10      20      30      40      50      60
Katzen1.SEQ  CTACGTGCAGGAGCTGGGCCTGAGCCTGGAAGAGAGCCGCGCGCAGCTGGGCTTCCTGCA
X::: : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
PKDMAUS.SEQ  CTACATACAGGAGTTAGGACTGAGTCTGGAGGAGAGCCGTGCACGACTGGGCTTCCTGCA
11740      11750      11760      11770      11780      11790

          70      80      90      100     110     120
Katzen1.SEQ  GCTGCACAACCTGGATCGACAACAGGTGCTCGCGCTCGGCCTGTCCCCGCTCTCCGCACT
: : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
PKDMAUS.SEQ  GCTGCACAACCTGGCTTGACAGCAGGAGC-CGTGCAGTGTTTGTAGAACTCACCCGCTACA
11800      11810      11820      11830      11840      11850

          130     140     150     160     170
Katzen1.SEQ  GCGGCGCTTCCGGCGGACACACCGGGGTCCCCACGCGGC-CCTCCTCCGGGGCCCTGCC
: : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
PKDMAUS.SEQ  GCCCTGCTGTGGGGCTCCATGCTGCTGTTACTGCGCCTCGAGTTCCTGTAGCCGGCC
11860      11870      11880      11890      11900      11910

          300     310     320     330     340
Katzen1.SEQ  GCCCCTTTCTCTGGGA-AGACACCCA-GTCTTTAC--CCTGC--CCGCCCTCTCGC---
: : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
PKDMAUS.SEQ  GACTGAGTCTGGAGGAGAGCCGTGCACGACTGGGCTTCCTGCAGCTGCACAACCTGGCTTG
11760      11770      11780      11790      11800      11810

          350     360     370     380     390     400
Katzen1.SEQ  CGTGTAGGAGCCGCACGGTGTTCGTGGAGCTCACGCGCTACAGCCCGGCCGTGGGGCTGC
: X: : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
PKDMAUS.SEQ  ACAGCAGGAGCCGTGCAGTGTTTGTAGAACTCACCCGCTACAGCCCTGCTGTGGGGCTCC
11820      11830      11840      11850      11860      11870

          410     420
Katzen1.SEQ  ACGCCGCCGTCACGCTGCGCCT
: : : : : : : : : : : X
PKDMAUS.SEQ  ATGCTGCTGTTACTGCGCCT
11880      11890

```

Bei der oberen Sequenz (Katzen1) handelt es sich um die katzenspezifische Sequenz. Die untere Sequenz (PKDMAU) sind Ausschnitte aus der in der Genbank veröffentlichten Sequenz des PKD1 Gens der Maus. Grau unterlegt ist das Ende des Exon 41 bzw der Beginn des Exon 42 an Base Nummer 11822/11823 der Maus. Die Exonabschnitte stimmen zu 81,7% miteinander überein.

Die Lage der Exons und Introns wurde aus dem Vergleich der katzenspezifischen Sequenz mit der caninen PKD1 Sequenz abgeleitet (Dackowski et al., 2002)

Normalerweise fängt ein Intron mit der Dinukleotidsequenz GT an und endet mit der Dinukleotidsequenz AG (Brown, 1993), so dass mit Hilfe dieser Regel die Exon - Introngrenzen in der felinen Sequenz ausgemacht werden konnten. Das Intron hat eine Länge von 270 Basenpaaren, von dem davor liegenden Exon sind 84 Basenpaare und von dem dahinter liegenden Exon sind 74 Basenpaare bekannt.

Trotz der strengen Auswahlkriterien für die verschiedene Primerpaare stellte sich die Amplifikation mit den entworfenen Primern als recht schwierig heraus. Das Gen ist sehr Guanin und- Cytosin reich. Diese Basen gelten als sehr "klebrig", so dass mit den Primern oft unspezifische Produkte amplifiziert wurden.

Abb.32: Ausschnitt aus dem humanen PKD1 Gen

```
gctggcccc gcgtgcatgc cagggggacg ctggtgccct ggagccaaca tctgcttgcc  
gctggaagcc tctgccacc cccaaggcctg cgccaatggc tgacgtag ggccaaggct acccggggcc  
ccctatgcmc tatggagaga gttcctcttc tccgttcccg cggggccccc cgcgagtag tcggtgtgtg
```

Der Ausschnitt aus dem humanen PKD1 Gen verdeutlicht den hohen Anteil an den Basen Guanin und Cytosin.

Das Primerpaar PKD5-8 funktionierte ausschließlich bei humanen und caninen Proben. Obwohl die eingesetzte Menge an DNS Ausgangsmaterial variiert wurde und unterschiedliche PCR Programme getestet wurden konnte kein befriedigendes PCR Produkt bei der Katze erzielt werden.

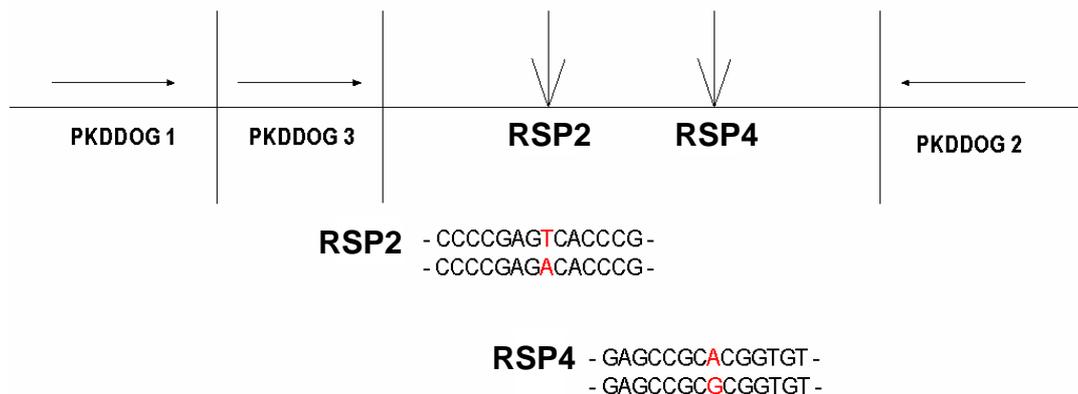
Das Primerpaar PKD9-11 lieferte ein PCR Produkt, welches aus dem Gel ausgeschnitten, gereinigt, kloniert und anschließend sequenziert wurde. Die daraus resultierenden Sequenzen hatten zwar die erwartete Größe, stimmten jedoch mit der Sequenz des entsprechenden Abschnittes des humanen PKD Gens nicht überein. Auch die Sequenzen der einzelnen Proben untereinander unterschieden sich stark. Diese hier erhaltenen PCR Produkte stammen somit nicht aus einem Abschnittes des PKD Gens.

5.3.2 Restriktionsschnittstellenpolymorphismus (RSP)

Aus der vorliegenden Sequenz wurde ein katzenspezifische Primer (PKDDOG3), der direkt vor dem Beginn des Introns liegt, entwickelt.

Dieser Primer ermöglichte bei der Durchführung der *seminested* PCR eine höhere Spezifität bei gleichzeitiger Verkürzung der PCR Programme. Das hieraus resultierende PCR Produkt besitzt inklusive des Primers eine Länge von 372 Basenpaaren.

Abb.33: Die Primer und Polymorphismen eines Abschnittes des feline PKD1 Genes



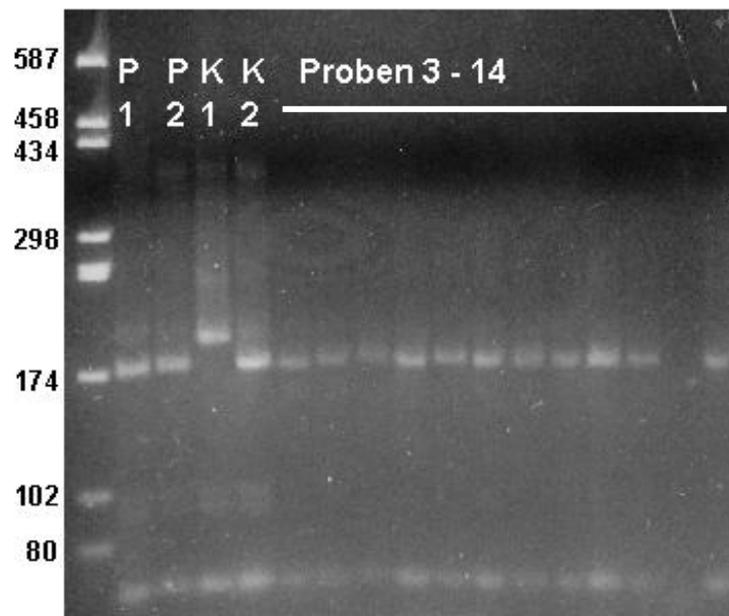
Diese schematische Darstellung zeigt die Lage der drei Primer (PKDDOG1, PKDDOG2, PKDDOG3) sowie die Lage der zwei untersuchten Polymorphismen (RSP2, RSP4). Die Pfeile oberhalb der Primer geben deren Richtung vom 5' zum 3' Ende an. Zur Amplifikation des Genabschnittes wurden zwei PCR's (*seminested PCR*), zunächst mit den Primern PKDDOG1 / PKDDOG2 und im Anschluß mit den Primern PKDDOG3 / PKDDOG2, durchgeführt. Bei den Polymorphismen handelt es sich um einzelne Basenaustausche, die rot gekennzeichnet sind.

5.3.3 Der Polymorphismus RSP4

Bei diesem Polymorphismus handelt es sich um eine Transition der Purine Adenin und Guanin an Position 361.

Diese Transition wurde mit Hilfe der Restriktionsendonuklease Bsh1236I (FnuDII) überprüft, wobei Typ I aufgrund des Basenaustausches eine Schnittstelle weniger als Typ II aufweist. Bsh1236I besitzt die Erkennungsstelle 5' C G▼ C G 3' und schneidet den amplifizierte Abschnitt des Allel Typ I in Fragmente der Länge 36bp, 64bp, 29bp, 197bp sowie 46bp und des Allel Typ II in 36bp, 64bp, 29bp, 176 bzw. 178bp, 22 bzw. 20bp sowie 46bp. Das vierte Fragment der zwei verschiedenen Allelformen hat somit einen Längenunterschied von 19 bzw. 21 Basenpaaren. Dieser Längenunterschied kann mit Hilfe der Agarosegelelektrophorese dargestellt werden.

Abb.34: Restriktion mit dem Enzym Bsh1236I (FnuDII) zur Überprüfung des Polymorphismus RSP4



DNS von PKD positiven und PKD negativen Tieren (P1, P2 und Proben 3-14) wurde mit Hilfe der Restriktionsendonuklease Bsh1236I (FnuDII) geschnitten. Das Fragment des Klons Typ I (K1) hat eine Länge von 197 Basenpaaren im Gegensatz zu dem Fragment des Klons Typ II (K2) welches eine Länge von 176 bzw. 178 Basenpaaren besitzt. Bei dem Marker (M) handelt es sich um puc/HaeIII. Die Länge der Markerfragmente ist am linken Bildrand angegeben.

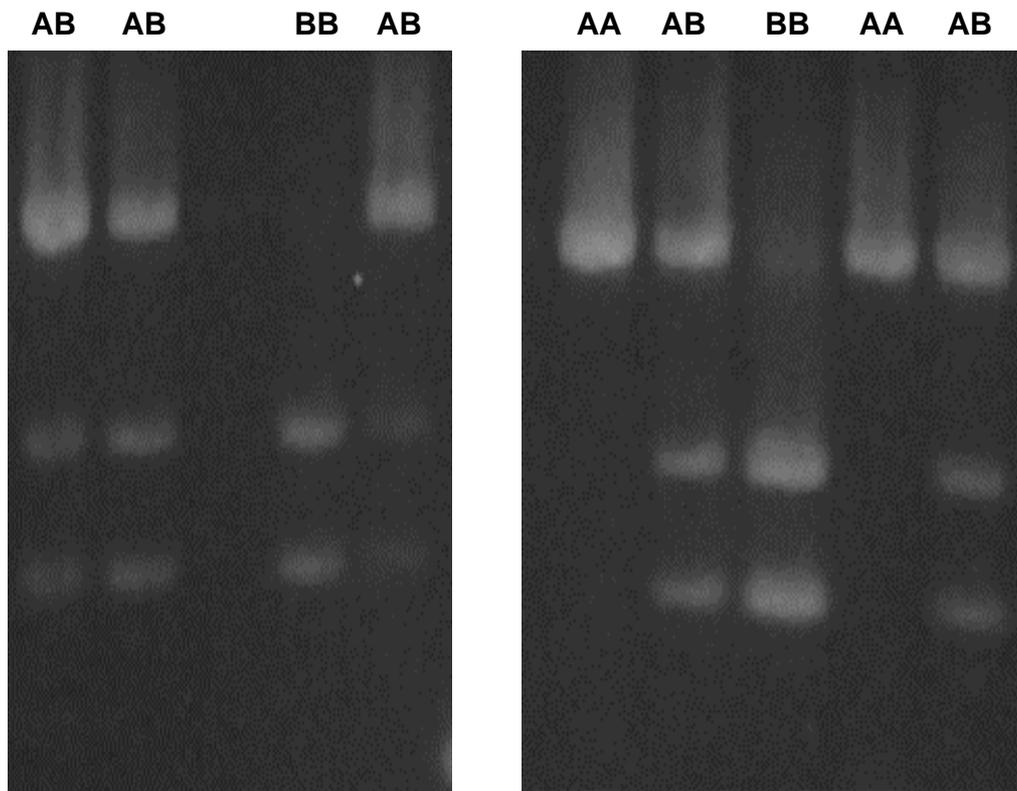
Mit der DNS von 7 PKD positiven und 7 PKD negativen Tieren wurde das Experiment durchgeführt, wobei die zwei Klone als Positivkontrolle verwendet

wurden. Als Längemarker kam puc/HaeIII zum Einsatz. Ein Längenunterschied war nur zwischen den zwei Klonen zu erkennen, während sich die überprüften Katzenproben nicht unterschieden (s. Abb. 34). Mit sehr großer Wahrscheinlichkeit handelt es sich daher um einen Sequenzierfehler.

5.3.4 Der Polymorphismus RSP2

Bei diesem Polymorphismus handelt es sich um eine Transversion des Pyrimidin Thymin und des Purin Adenin an Position 281.

Abb.35: Restriktion mit dem Enzym Hinf I zur Überprüfung des Polymorphismus RSP2



Zur Überprüfung des Restriktionspolymorphismus RSP2 wurde die DNS verschiedener Katzenproben mit dem Enzym Hinf I verdaut. Das Allel, welches die Schnittstelle trägt wurde mit A und das Allel dem die Schnittstelle fehlt mit B bezeichnet. Bei der oberen Bande handelt es sich um das nicht geschnittene Allel (A) und bei den beiden unteren Banden um das geschnittene Allel (B). So ergeben sich die Genotypen AA für zwei Allele ohne Schnittstelle, BB für zwei Allele mit Schnittstelle und AB für ein Allel mit und ein Allel ohne Schnittstelle.

Zur Überprüfung des Polymorphismus RSP2 wurde die Restriktionsendonuklease Hinf I verwendet. Die Erkennungssequenz des Enzymes lautet 5' G ▼ A N T C 3', wobei N jede der vier möglichen Basen sein kann. Aufgrund des Basenaustausches hat Typ I eine Schnittstelle. Der amplifizierte Abschnitt von Typ I wird in Fragmentlängen von 222bp und 150bp geschnitten, während Typ II keine Schnittstelle enthält und somit seine Länge von 372bp beibehält. Daraus ergibt sich ein Längenunterschied des ersten Fragmentes von 150 Basenpaaren. Dieser Polymorphismus konnte mit diesem Experiment bestätigt werden.

Insgesamt wurde DNS von 154 Katzen auf diesen Polymorphismus hin überprüft und folgende Verteilung konnte ermittelt werden. Im weiteren wird das Allel Typ I mit der Schnittstelle an Position 222 als Allel A und das Allel Typ II ohne die Schnittstelle an Position 222 als Allel B bezeichnet.

Tabelle 10: Verteilung des Restriktionsschnittstellenpolymorphismus RSP2 in der Stichprobe

	Insgesamt		davon PKD negativ		davon PKD positiv		davon PKD unbekannt	
Anzahl Tiere AA	117	76%	46	39,3%	68	58,1%	3	2,6%
Anzahl Tiere AB	35	22,7%	23	58,1%	11	31,4%	1	2,9%
Anzahl Tiere BB	2	1,3%	2	100%	0	0	0	0

Insgesamt wurde DNS von 154 Katzen auf den Polymorphismus RSP2 überprüft. Das Allel Typ I mit der Schnittstelle an der Position 222 wird mit A und das Allel Typ II ohne Schnittstelle wird mit B bezeichnet. Angegeben ist wie oft die Genotypen AA, AB und BB insgesamt (absolute Anzahl der Tiere und prozentuelle Anteil) in der Stichprobe vorkommen. Weiterhin ist der jeweilige Anteil an PKD positiven und PKD negativen Tieren sowie der jeweilige Anteil an Tieren mit unbekanntem PKD Status angegeben.

5.3.4.1 Genotyp- und Allelfrequenzen für den Polymorphismus RSP2

Im folgenden wird, für die allgemeine Darstellung, der dominante homozygote Genotyp mit D und dessen Frequenz mit $f(D)$ gekennzeichnet. Entsprechend wird der heterozygote Genotyp mit H, dessen Frequenz mit $f(H)$ und der rezessive homozygote Genotyp mit R sowie dessen Frequenz mit $f(R)$ bezeichnet.

In dieser Stichprobe ergeben sich folgende absolute Häufigkeiten

Genotyp AA = D = 117 Tiere

Genotyp AB = H = 35 Tiere

Genotyp BB = R = 2 Tiere

Die Genotypfrequenz berechnet sich nach der Formel (1).

$$(1) \quad X / N$$

wobei X die absolute Anzahl der Tiere eines Genotyps und N die Gesamtzahl der Stichprobe ist.

Für den vorliegenden Fall ($N = 154$) ergeben sich folgende Genotypfrequenzen:

$$\text{Genotypfrequenz AA} = f(D) = D/N = 0,760$$

$$\text{Genotypfrequenz AB} = f(H) = H/N = 0,227$$

$$\text{Genotypfrequenz BB} = f(R) = R/N = 0,013$$

Die Berechnung der Allelfrequenzen (f) erfolgt nach der Formel (2).

$$(2) \quad f = 2H_0 + H_E / 2N$$

wobei H_0 : Anzahl der Homozygoten eines bestimmten Allels

H_E : Anzahl der Heterozygoten eines bestimmten Allels

N : Gesamtzahl der untersuchten Stichprobe

Berechnung der Allelfrequenz (f) nach der Formel (2) für Allel A bzw. Allel B:

$$f(A) = p = 0,87$$

$$f(B) = q = 0,13$$

Die Summe der Allelfrequenzen ist immer 1. Somit läßt sich bei zwei Allelen die Allelfrequenz des zweiten Allels auch vereinfacht aus $q = 1 - p$ ermitteln.

5.3.4.2 Die Berechnung der Heterozygotie

Die Berechnung der Heterozygotie (H_E) erfolgt nach der Formel (3):

$$(3) \quad H_E = 1 - \sum x_i^2$$

wobei x_i die Frequenz des i ten Allels an einem Locus ist.

Die Berechnung nach der Formel (3) ergibt:

$$H_E = 1 - (p^2 + q^2) = 1 - (0,87^2 + 0,13^2) = 0,226$$

Der Polymorphismus RSP2 besitzt in dieser Stichprobe einen Heterozygotiewert von 0,226

5.3.4.3 Test auf Hardy-Weinberg-Gleichgewicht

Die Beziehung zwischen den Genotypen- und Allelfrequenzen verschiedener Generationen einer Idealpopulation wird als Hardy-Weinberg-Gesetz bezeichnet:

"In einer großen Population mit Zufallspaarung sind bei Abwesenheit von Selektion, Mutation und Migration die Genotyp- und Allelfrequenzen von Generation zu Generation konstant."

Trifft diese Definition auf eine Population zu, so bezeichnet man diese als im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht befindlich (Schüler et al., 2001).

Die Häufigkeit der Gameten, die das Allel A bzw. das Allel B tragen entspricht deren Allelfrequenzen p bzw. q . Die Genotypenfrequenzen bei den Nachkommen ist in Tabelle 11 dargestellt.

Tabelle 11: Häufigkeit der Nachkommengentypen bei Zufallspaarung

		weibliche Gameten	
		A (p)	B (q)
männliche Gameten	A (p)	AA p^2	AB pq
	B (q)	BA pq	BB q^2

Die Genotypfrequenzen in der F1 Generation lassen sich bei Zufallspaarung aus den jeweiligen Allelfrequenzen berechnen. Wobei hier p die Allelfrequenz von Allel A und q die Allelfrequenz von Allel B bezeichnet.

Quelle: Schüler et al., 2001

Die Summe der Genotypfrequenzen bei den Nachkommen ist somit:

$$(p+q)^2 = p^2+2pq+q^2$$

Das Hardy-Weinberg-Gesetz gilt auch innerhalb einer Generation, so dass man, vorausgesetzt die Population befindet sich im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht, aus den Allelfrequenzen auf die Genotypfrequenzen und umgekehrt schließen kann. Die Genotypfrequenzen der Nachkommen hängen ausschließlich von den Allelfrequenzen der Eltern ab und nicht von deren Genotypfrequenzen (Schüler et al., 2001).

Bei dem Test auf Hardy-Weinberg-Gleichgewicht werden die erwarteten Genotypfrequenzen mit den beobachteten Genotypfrequenzen verglichen und anschließend die Differenz mit dem Erwartungswert in Beziehung gesetzt. Der erhaltene χ^2 -Wert erlaubt unter Berücksichtigung der Freiheitsgrade eine Aussage über die Hypothese, dass sich eine Population im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht befindet (Schüler et al., 2001).

Die erwarteten Genotypfrequenzen (f_E) bzw. erwarteten absoluten Genotypfrequenz ($f_{Eabs.}$) errechnen sich wie folgt:

$$f_E(A/A) = f(A)^2 = (0,87)^2 = 0,7569$$

$$f_{Eabs.}(A/A) = f(A)^2 \times N = 116,5$$

$$f_E(A/B) = 2 \times f(A) \times f(B) = 0,226$$

$$f_{Eabs.}(A/B) = 2 \times f(A) \times f(B) \times N = 34,8$$

$$f_E(B/B) = f(B)^2 = (0,13)^2 = 0,017$$

$$f_{Eabs.}(B/B) = f(B)^2 \times N = 2,6$$

Tabelle 12: Test auf Hardy-Weinberg-Gleichgewicht

	absolute Genotypfrequenzen		
	AA	AB	BB
$f_{Eabs.}$	116,5	34,8	2,6
$f_{Babs.}$	117	35	2
Differenz zw. $f_{Eabs.}$ und $f_{Babs.}$	0,5	0,2	0,6
$d^2 / f_{Eabs.}$	0,002	0,0012	0,139
χ^2 -Wert	0,1422		

Bei der Berechnung des χ^2 -Wertes werden die erwarteten absoluten Genotypfrequenzen ($f_{Eabs.}$) mit den beobachteten absoluten Genotypfrequenzen ($f_{Babs.}$) verglichen und anschließend die Differenz (d) mit dem Erwartungswert in Beziehung gesetzt.

Der Vergleichswert (p) liegt bei einem Freiheitsgrad und einem α von 0,05 bei 3,84. Der in der vorliegenden Stichprobe ermittelte χ^2 -Wert von 0,142 (s. Tab. 12) ist kleiner und somit gibt es keinen Grund die Hypothese "Population befindet sich im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht" abzulehnen.

5.4 Polymorphismus am Markerloкус FCA 476

Der Marker FCA 476 liegt laut einer Karte der LGD (Laboratory of Genomic Diversity) in unmittelbarer Nähe des PKD1 Gen der Katze auf dem Chromosom E3. In einem Bericht anlässlich der "cat disease conference" von 1998, der Penn State University, USA wird von einer Kopplung des Dinukleotid Repeat Locus FCA 476 (CA Dinukleotid Repeat) und dem PKD1 Gen der Katze berichtet (DiBartola et al., 1999). Mit dem Ziel einen Polymorphismus in der vorliegenden Stichprobe darzustellen, um somit eine Assoziation bzw. Kopplung mit dem Polyzystischen Syndrom aufzuzeigen, wurden die Proben mittels Autoradiographie überprüft.

5.4.1 Der Markerlocus FCA 476

Die mit den Primern CAT476F und CAT476R gewonnene Amplikons wurde mittels Autoradiogramm dargestellt. Die Ergebnisse von 152 Tieren konnten ausgewertet werden. Anhand der Länge und der Kombination der vorkommenden Banden konnten insgesamt 13 unterschiedliche Typen ermittelt werden. Die am häufigsten vorkommende Bande wurde mit 100 bezeichnet. Von dort aus die darüberliegenden mit 101 sowie 102 und die darunterliegenden entsprechend mit 99, 98, 97.

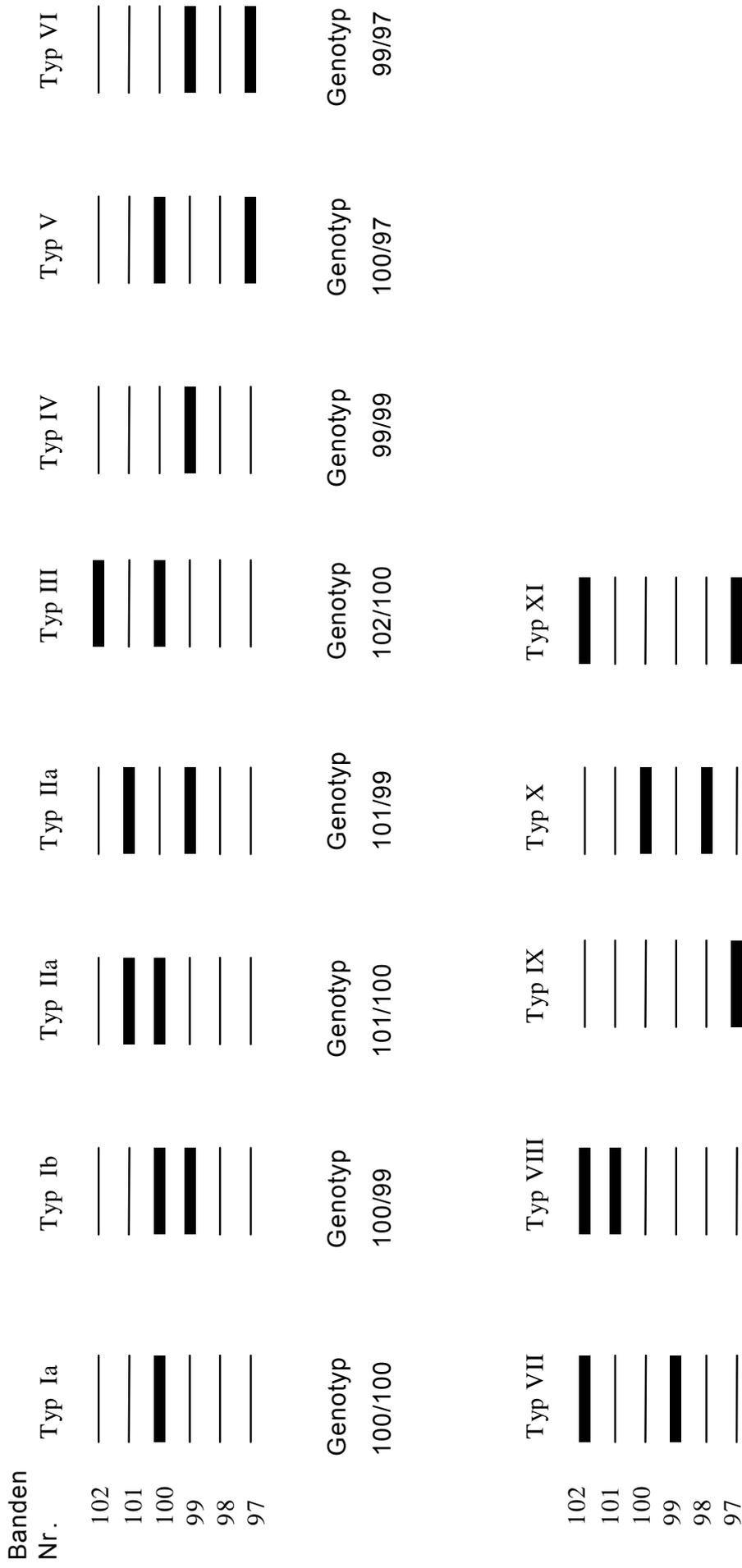
Tabelle 13: Typen- und Bandenbezeichnung bei dem Polymorphismus am Markerlocus FCA 476

Typ	Banden	Typ	Banden
I a	100	VI	99
	100		97
I b	100	VII	102
	99		99
II a	101	VIII	102
	100		101
II b	101	IX	97
	99		97
III	102	X	100
	100		98
IV	99	XI	102
	99		97
V	100		
	97		

Anhand der Länge und der Kombination der vorkommenden Banden konnten insgesamt 13 unterschiedliche Typen ermittelt werden. Die am häufigsten vorkommende Bande wurde mit 100 bezeichnet. Von dort aus die darüberliegenden mit 101 sowie 102 und die darunterliegenden entsprechend mit 99, 98, 97.

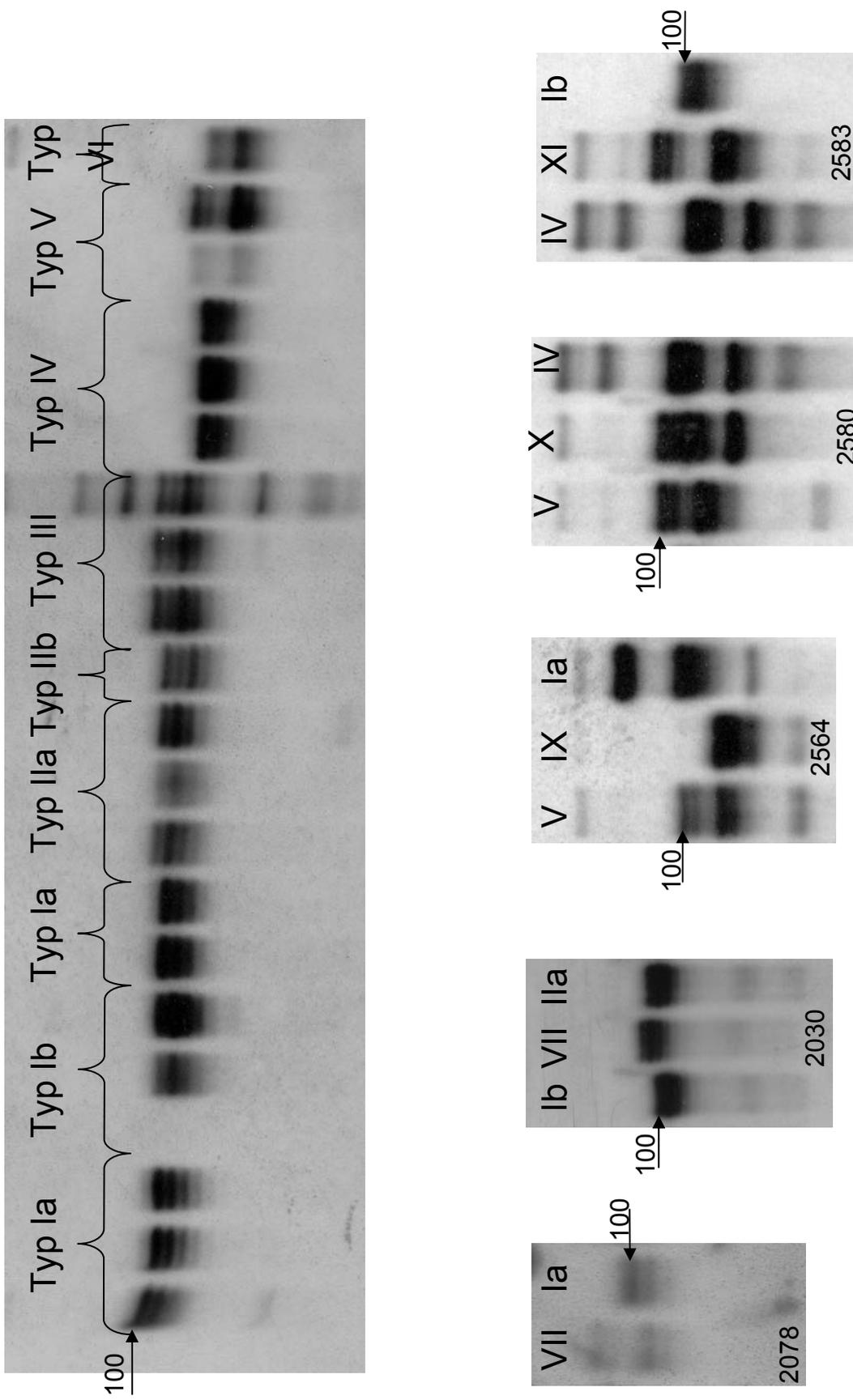
Es handelt sich somit um sechs verschiedene Allele, die theoretisch jeder Kombination vorkommen können.

Abb. 36: Graphische Darstellung des Polymorphismus am Markerlokus FCA 476



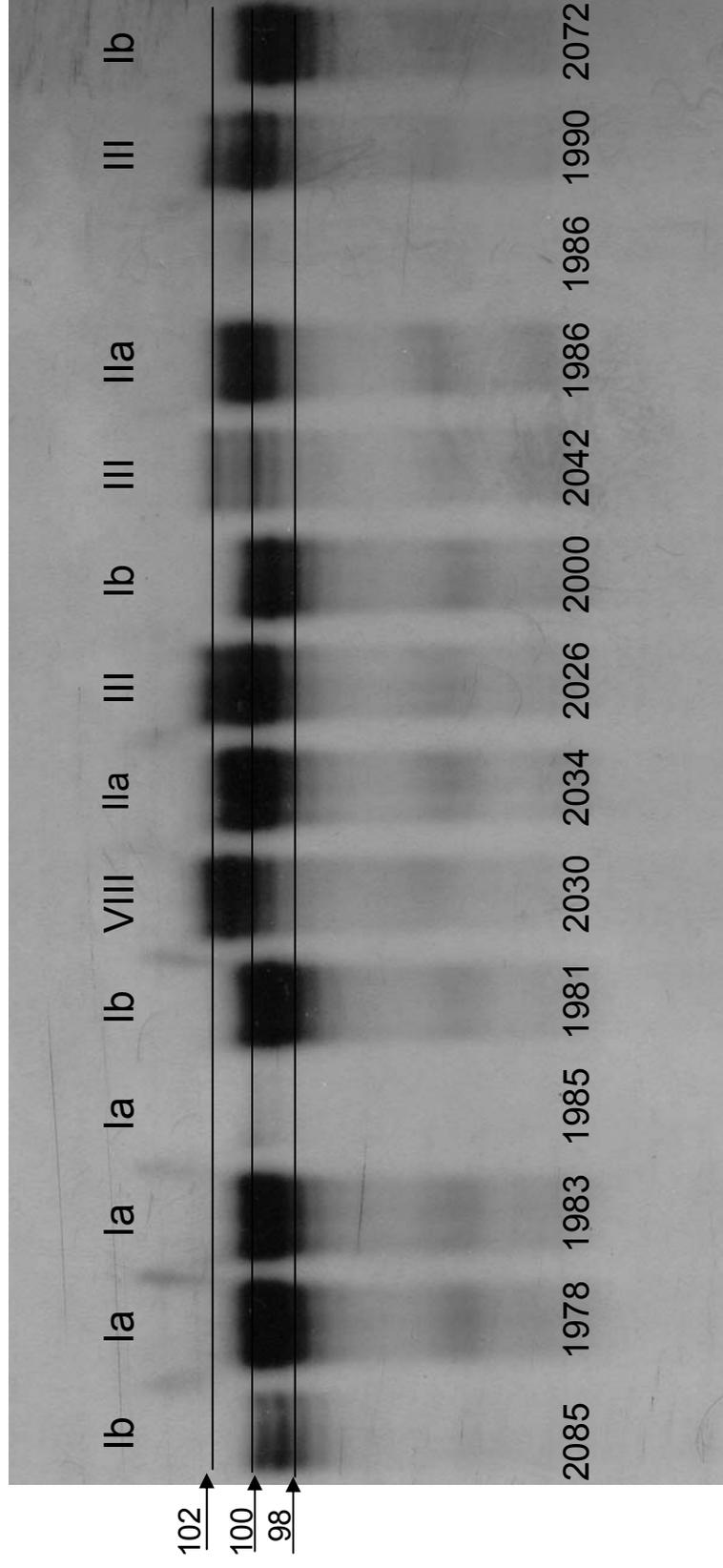
Bei der Darstellung des Polymorphismus am Markerlokus FCA 476 konnten insgesamt 13 unterschiedliche Typen ermittelt werden. Die vorkommenden Banden wurden mit den Zahlen 102 bis 97 gekennzeichnet. Bei diesem Polymorphismus handelt es sich um sechs Allele die in ihrer Kombination 21 verschiedene Genotypen bilden können. In unserer Stichprobe waren jedoch nur 13 der Genotypen vorhanden.

Abb. 37: Unterscheidung der verschiedenen Genotypen des Polymorphismus am Markerloкус FCA 476



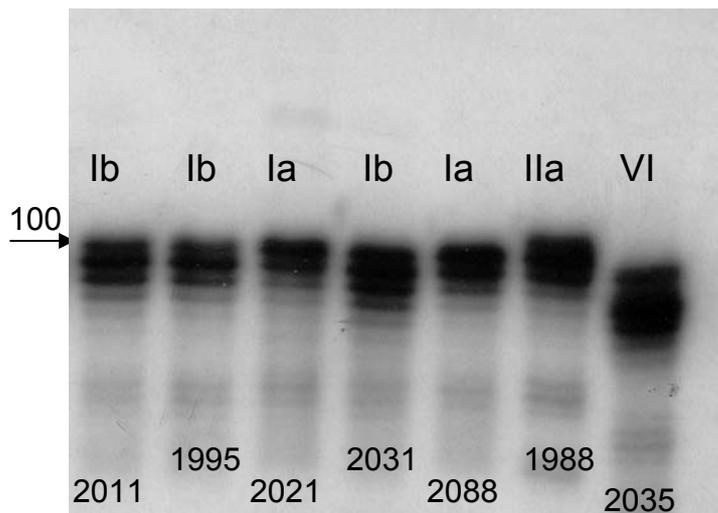
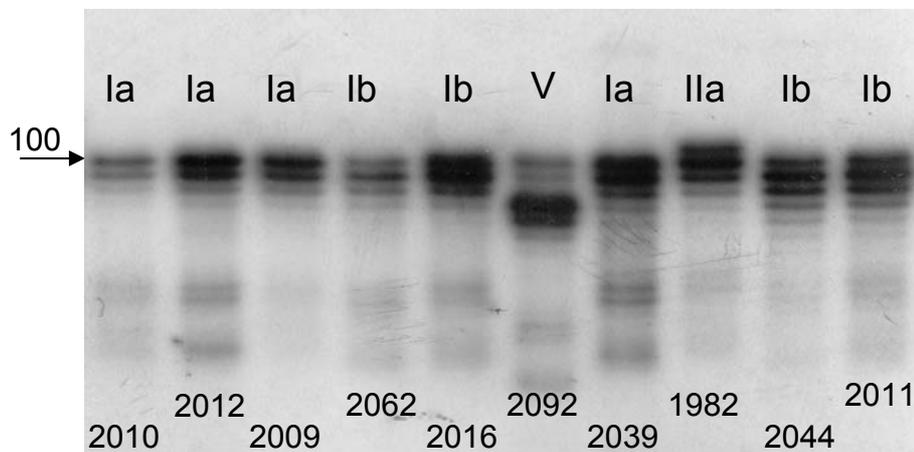
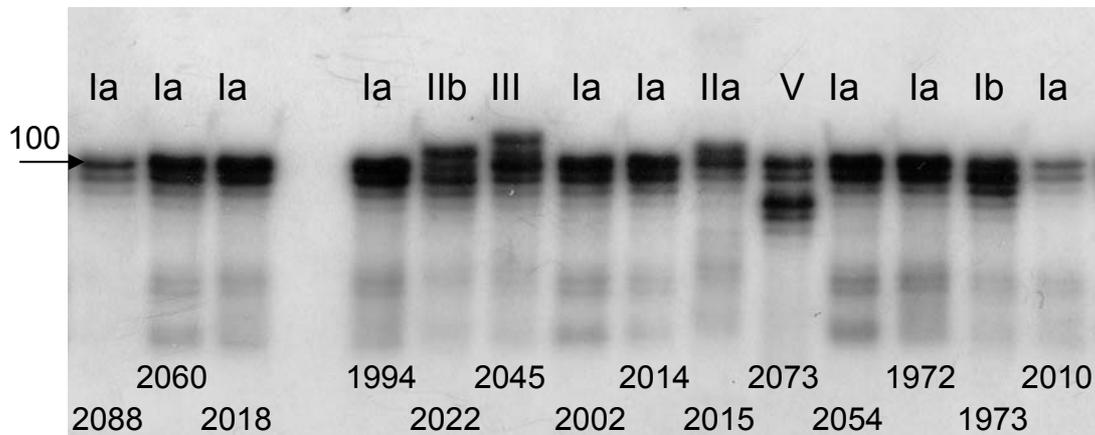
Diese Darstellung zeigt die unterschiedlichen Genotypen im Vergleich. Der Pfeil deutet auf die mit 100 benannte Bande. Insgesamt konnten 13 verschiedene Typen ausgemacht werden.

Abb. 38: Darstellung der verschiedenen Genotypen des Polymorphismus am Markerloкус FCA 476



Die Darstellung zeigt verschiedene Genotypen anhand einer Auswahl von Proben. Die Hilfslinien bezeichnen die Laufhöhe der Banden, wobei zu beachten ist, dass diese stark idealisiert sind und die einzelnen Banden aufgrund ihrer unterschiedlichen Stärke nicht 100%ig auf den Linien zu liegen kommen.

Abb. 39: Darstellung des Polymorphismus am Markerlokus FCA 476



Die mit dem Primerpaar FCA 476 amplifizierten Proben wurden radioaktiv markiert und auf einem Polyacrylamid Gel aufgetrennt. Die Unterschiedliche Höhe der einzelnen Banden ist zu erkennen. Bei dem Genotyp lb (100/99) ist im Gegensatz zum Genotyp la (100/100) die zweite Bande stärker als die erste und läßt sich so von den Stotterbanden unterscheiden.

Die theoretisch möglichen Genotypen und die Anzahl der in der Stichprobe aufgefundenen Genotypen sind in der Tabelle 14 dargestellt. Insgesamt wurden 152 Tiere hinsichtlich ihres Genotyps am Markerloкус FCA 476 überprüft.

Tabelle 14: Anzahl der in der Stichprobe vorkommenden Genotypen

	102	101	100	99	98	97
102	0					
101	1	0				
100	20	10	56			
99	3	1	43	8		
98	0	0	1	0	0	
97	1	0	6	1	0	1

Die Tabelle zeigt die theoretisch möglichen Genotypen des Polymorphismus am Markerloкус und gibt die Anzahl der in der Stichprobe vorkommenden Genotypen an.

Tabelle 15: Die möglichen Haplotypen und ihre prozentuelle Verteilung

Haplotyp	100 / 100	100 / 102	100 / 101	100 / 99	100 / 98	100 / 97
Anzahl Tiere	56	20	10	43	1	6
Prozentueller Anteil	36,84%	13,16%	6,58%	28,29%	0,66%	3,95%

Haplotyp	102 / 102	102 / 101	102 / 99	102 / 98	102 / 97
Anzahl Tiere	0	1	3	0	1
Prozentueller Anteil	0	0,66%	1,97%	0	0,66%

Haplotyp	101 / 101	101 / 99	101 / 98	101 / 97
Anzahl Tiere	0	1	0	0
Prozentueller Anteil	0	0,66%	0	0

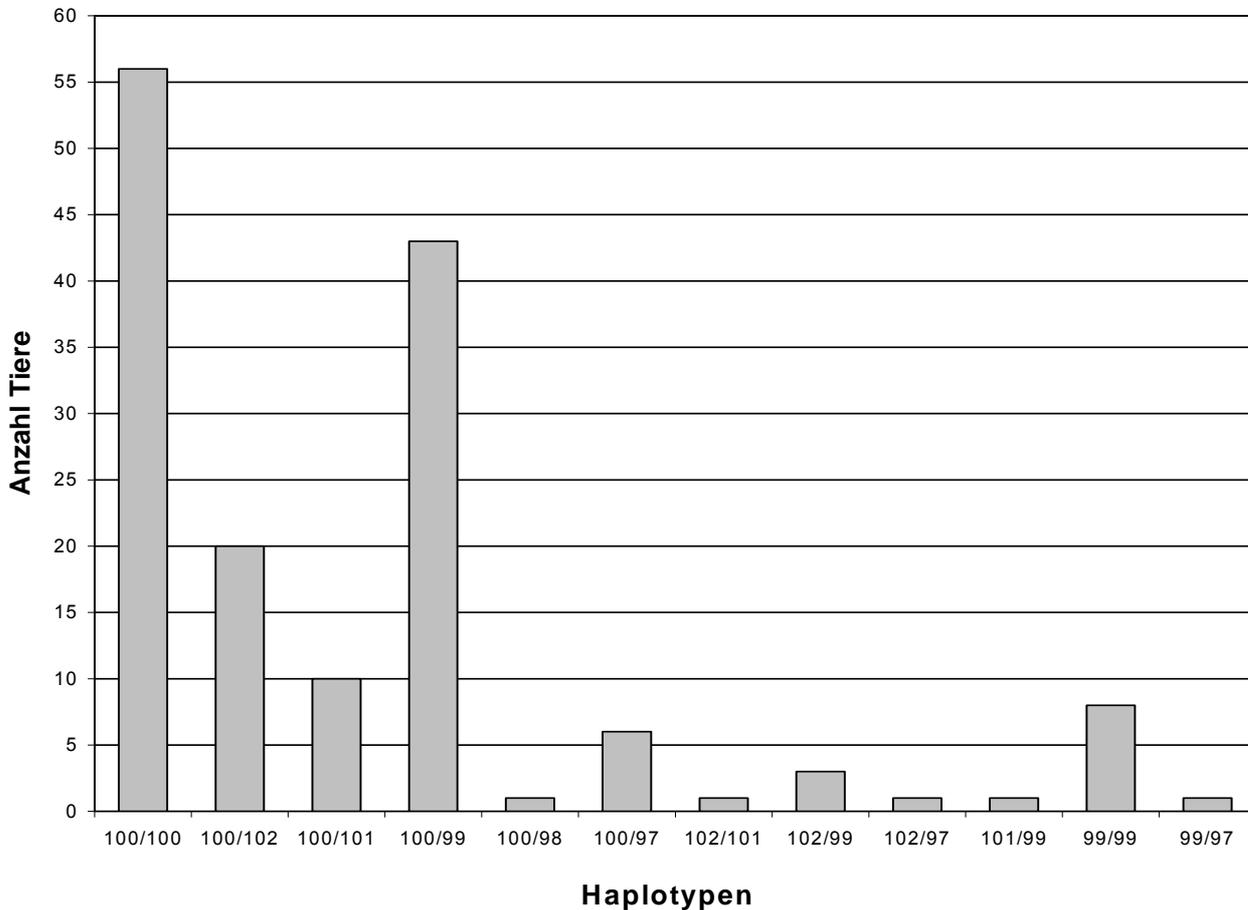
Haplotyp	99 / 99	99 / 98	99 / 97
Anzahl Tiere	8	0	1
Prozentueller Anteil	5,26%	0	0,66%

Haplotyp	98 / 98	98 / 97	97 / 97
Anzahl Tiere	0	0	1
Prozentueller Anteil	0	0	0,66%

Diese Tabelle gibt einen Überblick über die möglichen Haplotypen und deren prozentuelle Verteilung in der Stichprobe. Von 21 möglichen Haplotypen der sechs Allele waren 13 in der Stichprobe vorhanden. Die Gesamtzahl der Stichprobe beläuft sich auf 152 Tiere.

Die Prozentuellen Anteile der jeweiligen Haplotypen an der Gesamtzahl der Stichprobe sind in Tabelle 15 aufgeführt.

Abb. 40: Verteilung der verschiedenen Haplotypen in der Stichprobe



Die graphische Darstellung verdeutlicht den hohen Anteil des Allel 100 in der Stichprobe. Entsprechen häufig kommen die Haplotypen die das Allel 100 beinhalten vor. Haplotypen die sich aus den anderen Allelen zusammensetzen haben einen recht geringen Anteil.

5.4.1.1 Die Berechnung der Allel- und Genotypfrequenzen

Berechnung der Allelfrequenz (f) nach der Formel (2) ergibt:

Allelfrequenz des Allels 100 = $f(100) = 0,63$

Allelfrequenz des Allels 102 = $f(102) = 0,08$

Allelfrequenz des Allels 101 = $f(101) = 0,04$

Allelfrequenz des Allels 99 = $f(99) = 0,21$

Allelfrequenz des Allels 98 = $f(98) = 0,003$

Allelfrequenz des Allels 97 = $f(97) = 0,033$

Aus den Allelfrequenzen lassen sich die erwarteten Genotypfrequenzen (f_E) berechnen. Um die erwarteten absoluten Genotypfrequenzen ($f_{Eabs.}$) zu erhalten wird die entsprechende Genotypfrequenz mit der Gesamtzahl ($N = 152$) der Stichprobe multipliziert. Die aus der Berechnung resultierenden Erwartungswerte sind in Tabelle 16 dargestellt.

Tabelle 16: Erwartungswerte der Genotypfrequenzen

Genotyp	erwartete Genotypfrequenz (f_E)	erwartete absolute Genotypfrequenzen ($f_{Eabs.}$)
100 / 100	0,3969	60,3
100 / 102	0,1008	15,3
100 / 101	0,0504	7,7
100 / 99	0,2646	40,2
100 / 98	0,0038	0,57
100 / 97	0,0416	6,3
102 / 102	0,0064	0,97
102 / 101	0,0064	0,97
102 / 99	0,0336	5,1
102 / 98	0,0005	0,07
102 / 97	0,0053	0,81
101 / 101	0,0016	0,24
101 / 99	0,0168	2,55
101 / 98	0,0002	0,04
101 / 97	0,0026	0,4
99 / 99	0,0441	6,7
99 / 98	0,0013	0,19
99 / 97	0,0139	2,1
98 / 98	0,000009	0,0014
98 / 97	0,0002	0,03
97 / 97	0,00011	0,017

Die Tabelle gibt die einzelnen Genotypen mit ihren erwarteten Genotypfrequenzen (f_E) und ihren erwarteten absoluten Genotypfrequenzen ($f_{Eabs.}$) wieder.

5.4.1.2 Berechnung der Heterozygotie

Die Berechnung der Heterozygotie erfolgt nach der Formel (3).

$$(3) \quad H_E = 1 - \sum x_i^2$$

wobei x_i die Frequenz des i -ten Allels an einem Locus ist

$$\begin{aligned} H_E &= 1 - [f(102)^2 + f(101)^2 + f(100)^2 + f(99)^2 + f(98)^2 + f(97)^2 \\ &= 1 - 0,08^2 + 0,04^2 + 0,63^2 + 0,21^2 + 0,003^2 + 0,033^2] = 0,55 \end{aligned}$$

5.4.1.3 Test auf Hardy-Weinberg-Gleichgewicht

Die Berechnung des Chi-Quadrat Wertes (χ^2) für diese Stichprobe ergab einen χ^2 -Wert von 11,56.

Bei den insgesamt sechs Allelen sind fünf Freiheitsgrade zu berücksichtigen.

Der Vergleichswert (p) liegt bei fünf Freiheitsgraden und einem α von 0,05 bei 11,07.

Der ermittelte χ^2 -Wert ist nur geringfügig größer und gibt keinen Anlaß die Hypothese "Population befindet sich im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht" abzulehnen.

5.4.1.4 Der Markerlocus FCA 476 und das Polyzystische Syndrom

Um eine mögliche Assoziation oder Kopplung des Polymorphismus am Markerlocus FCA 476 mit dem Polyzystischen Syndrom (PKD) zu ermitteln wurden zunächst den einzelnen Genotypen die Anzahl der PKD positiven bzw. der PKD negativen Tiere zugeordnet (s. Tabelle 17).

Tabelle 17: Zusammenfassung der beiden Merkmale Polymorphismus am Markerlocus und Polyzystisches Syndrom

FCA 476	PKD negativ	PKD positiv	PKD unbekannt	Summe 1
100 / 100	14	41	1	56
100 / 99	21	22	0	43
101 / 100	2	7	1	10
101 / 99	1	0	0	1
102 / 100	13	7	0	20
99 / 99	7	1	0	8
100 / 97	4	2	0	6
99 / 97	1	0	0	1
102 / 99	3	0	0	3
102 / 101	1	0	0	1
100 / 98	0	1	0	1
102 / 97	1	0	0	1
97 / 97	1	0	0	1
Summe 2	69	81	2	

In der Tabelle sind die beiden Merkmale Genotyp am Markerlocus FCA 476 und Krankheitsstatus bezüglich des Polyzystischen Syndroms (PKD) zusammengefaßt. In der Spalte 1 sind die Genotypen des Polymorphismus am Markerlocus (FCA 476) aufgeführt. Die Spalten 2 und 3 geben die Anzahl der Tiere wieder, die den entsprechenden Genotyp tragen. In der Spalte 4 sind die Tiere mit unbekanntem PKD Status (PKD unbekannt) aufgelistet. Summe 1 gibt die Gesamtzahl der Tiere des entsprechenden Genotyps für FCA 476 und Summe 2 die Gesamtzahl der Tiere des entsprechenden PKD Status wieder.

Bei der Zusammenfassung der beiden Merkmale Genotyp am Markerloкус FCA 476 und Krankheitsstatus bezüglich des Polyzystischen Syndroms waren sehr kleine Zellenbesetzungen vorhanden. Zudem hinterließ die Tabelle 17 den Eindruck einer Assoziation bzw. Kopplung des positiven PKD Status mit dem Allel 100 des Polymorphismus am Markerloкус FCA 476. Aus diesem Grund wurden für die Durchführung der folgenden Berechnungen die Genotypen bezüglich des Polymorphismus am Markerloкус FCA 476 auf die zwei Allele "100" und "nicht 100" (= 100⁻) reduziert. Unter der Bezeichnung 100⁻ werden die Allele 97, 98, 99, 101 und 102 zusammengefaßt.

5.5 Assoziationsstudie für die Marker RSP2 und FCA 476 mit dem Polyzystischen Syndrom

These: Wenn das Polyzystische Syndrom (PKD) nicht mit den beiden Markerloci (RSP2 und FCA 476) assoziiert ist, dann sollten sich Teilstichproben, die sich durch Einteilung in gesunde (PKD negativ) und kranke (PKD positiv) Tiere ergeben nicht signifikant von der Gesamtstichprobe unterscheiden.

Für diese Berechnung wurden 111 Tiere, die nach den verfügbaren Stammbaumdaten nicht miteinander verwandt waren ausgewählt, um Häufungen bestimmter Haplotypen durch Familien zu vermeiden.

Die Ausgangsdaten der Gesamtstichprobe sind in Tabelle 18 dargestellt.

Die Berechnung der Allelfrequenzen (f) erfolgt nach der Formel (2).

$$(2) \quad f = 2H_0 + H_E / 2N$$

wobei H_0 : Anzahl der Homozygoten eines bestimmten Allels
 H_E : Anzahl der Heterozygoten eines bestimmten Allels
N : Gesamtzahl der untersuchten Stichprobe

Folgende Allelfrequenzen (f) werden für die Gesamtstichprobe (n = 111) nach der Formel (2) ermittelt:

$$f(h) = p = 0,8694$$

$$f(H) = q = 0,1306$$

$$f(100) = r = 0,6621$$

$$f(100^-) = s = 0,3379$$

Tabelle 18: Ausgangsdaten der Gesamtstichprobe

Marker RSP2	Marker FCA 476	PKD positiv	PKD negativ	Insgesamt
	100/100	29	7	36
hh	100/100 ⁻	22	22	44
	100 ⁻ /100 ⁻	1	3	4
	100/100	3	5	8
hH	100/100 ⁻	5	9	14
	100 ⁻ /100 ⁻	0	3	3
	100/100	0	0	0
HH	100/100 ⁻	0	1	1
	100 ⁻ /100 ⁻	0	1	1

Die Tabelle gibt die Anzahl der Tiere mit ihren entsprechenden Genotypen für die Marker RSP2 und FCA 476, sowie deren jeweiligen PKD Status wieder.

Aus den Allelfrequenzen lassen sich die erwarteten Genotypfrequenzen (f_E) bzw. die absoluten erwarteten Genotypfrequenzen ($f_{Eabs.}$) berechnen. Folgende Erwartungswerte wurden für die beiden Marker (RSP2 und FCA 476) in Gesamtstichprobe berechnet:

$$\begin{array}{ll}
f_E(h/h) = 0,7559 & f_{Eabs.}(h/h) = 83,9 \\
f_E(h/H) = 0,2271 & f_{Eabs.}(h/H) = 25,21 \\
f_E(H/H) = 0,0171 & f_{Eabs.}(H/H) = 1,89 \\
f_E(100/100) = 0,4384 & f_{Eabs.}(100/100) = 48,6624 \\
f_E(100/100^-) = 0,4474 & f_{Eabs.}(100/100^-) = 49,6614 \\
f_E(100^-/100^-) = 0,1142 & f_{Eabs.}(100^-/100^-) = 12,6762
\end{array}$$

Der Test auf Hardy-Weinberg Gleichgewicht ergibt für den Marker FCA 476 einen χ^2 -Wert von 3,93 und für den Marker RSP2 einen χ^2 -Wert von 0,0078. Bei einem Freiheitsgrad und einem α von 0,05 weicht der χ^2 -Wert für den Marker FCA 476 nicht wesentlich von dem angegebenen Vergleichswert (p) = 3,84 ab. Daher wird von keiner signifikanten Abweichung vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht ausgegangen.

Für die Teilstichprobe, die alle PKD positiven Tiere der Gesamtstichprobe enthält ergeben sich die in Tabelle 19 aufgeführten Beobachtungswerte.

Tabelle 19: Genotyphäufigkeiten an den Loci FCA 476 und RSP2 innerhalb PKD positiver Tiere

Marker FCA 476	100/100	100/100-	100-/100-
Anzahl	32	27	1
Marker RSP2	h/h	h/H	H/H
Anzahl	52	8	0

Die Tabelle gibt die Anzahl der Tiere mit ihren entsprechenden Genotypen für die Marker RSP2 und FCA 476 in der Teilstichprobe PKD positiv wieder

Folgende Allelfrequenzen wurden für die Teilstichprobe PKD positiv ($n = 60$) nach der Formel (2) ermittelt:

$$\begin{array}{l}
f(h) = p = 0,9333 \\
f(H) = q = 0,0667 \\
f(100) = r = 0,7583 \\
f(100-) = s = 0,2417
\end{array}$$

Folgende Erwartungswerte wurden für die beiden Marker (RSP2 und FCA 476) in der Teilstichprobe PKD positiv berechnet:

$$\begin{array}{ll}
 f_E(h/h) = 0,8710 & f_{Eabs.}(h/h) = 52,26 \\
 f_E(h/H) = 0,1245 & f_{Eabs.}(h/H) = 7,47 \\
 f_E(H/H) = 0,0045 & f_{Eabs.}(H/H) = 0,27 \\
 f_E(100/100) = 0,5750 & f_{Eabs.}(100/100) = 34,5 \\
 f_E(100/100^-) = 0,3665 & f_{Eabs.}(100/100^-) = 21,99 \\
 f_E(100^-/100^-) = 0,0585 & f_{Eabs.}(100^-/100^-) = 3,51
 \end{array}$$

Der Test auf Hardy-Weinberg Gleichgewicht ergibt für den Marker FCA 476 einen χ^2 -Wert von 3,11 und für den Marker RSP2 einen χ^2 -Wert von 0,31. Bei einem Freiheitsgrad und einem α von 0,05 gibt es keinen Grund die Hypothese "Population befindet sich im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht" abzulehnen.

Für die Teilstichprobe, die alle PKD negativen Tiere der Gesamtstichprobe enthält ergeben sich die in Tabelle 20 aufgeführten Beobachtungswerte.

Tabelle 20: Genotyphäufigkeiten an den Loci FCA 476 und RSP2 innerhalb PKD negativer Tiere

Marker FCA 476	100/100	100/100-	100-/100-
Anzahl	12	32	7
Marker RSP2	h/h	h/H	H/H
Anzahl	32	17	2

Die Tabelle gibt die Anzahl der Tiere mit ihren entsprechenden Genotypen für die Marker RSP2 und FAC476 in der Teilstichprobe PKD negativ wieder

Folgende Allelfrequenzen wurden für die Teilstichprobe PKD negativ (n = 51) nach der Formel (2) ermittelt:

$$f(h) = p = 0,7941$$

$$f(H) = q = 0,2058$$

$$f(100) = r = 0,5490$$

$$f(100-) = s = 0,4510$$

Folgende Erwartungswerte wurden für die beiden Marker (RSP2 und FCA 476) in der Teilstichprobe PKD negativ berechnet:

$$f_E(h/h) = 0,6306 \quad f_{Eabs.}(h/h) = 32,16$$

$$f_E(h/H) = 0,3269 \quad f_{Eabs.}(h/H) = 16,67$$

$$f_E(H/H) = 0,0424 \quad f_{Eabs.}(H/H) = 2,16$$

$$f_E(100/100) = 0,3014 \quad f_{Eabs.}(100/100) = 15,37$$

$$f_E(100/100^-) = 0,4952 \quad f_{Eabs.}(100/100^-) = 25,26$$

$$f_E(100^-/100^-) = 0,2034 \quad f_{Eabs.}(100^-/100^-) = 10,37$$

Der Test auf Hardy-Weinberg Gleichgewicht ergibt für den Marker FCA 476 einen χ^2 -Wert von 3,64 und für den Marker RSP2 einen χ^2 -Wert von 0,019. Bei einem Freiheitsgrad und einem α von 0,05 gibt es keinen Grund die Hypothese "Population befindet sich im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht" abzulehnen.

Die ermittelten Allelfrequenzen unterscheiden sich in den beiden Subpopulationen (PKD positiv und PKD negativ) deutlich von den Allelfrequenzen der Gesamtstichprobe. Diese Tatsache gibt einen Hinweis darauf, dass das Polyzystische Syndrom (PKD) mit den beiden Markerloci (RSP2 und FCA 476) assoziiert ist.

Aufgrund dieses Hinweises soll im folgenden die Haplotypenverteilung in der Gesamtstichprobe und in den Teilstichproben, auf die aufgestellte These hin, überprüft werden. Die aufgestellte These lautet: Wenn das Polyzystische Syndrom (PKD) nicht mit den beiden Markerloci (RSP2 und FCA 476) assoziiert ist, dann sollten sich Teilstichproben, die sich durch Einteilung in gesunde (PKD negativ) und kranke (PKD positiv) Tiere ergeben nicht signifikant von der Gesamtstichprobe unterscheiden.

In der Gesamtstichprobe besteht die in Tabelle 21 aufgeführte Haplotypenverteilung. Bei doppelt heterozygoten Tieren können Haplotypen nicht eindeutig zugeordnet werden. Daher wird zunächst die Anzahl der sicher beobachteten Haplotypen ermittelt. Folgende Anzahl sicher beobachteter Haplotypen ist in der Gesamtstichprobe vorhanden:

h/100 124
h/100⁻ 55
H/100 9
H/100⁻ 6

Bei den 14 doppelt heterozygoten Tieren setzen sich die Haplotypen aus den zwei Kombinationsmöglichkeiten h/100 und H/100⁻ oder H/100 und h/100 zusammen. Für die spätere Auswertung wird der χ^2 -Wert für alle möglichen Verteilungen einzeln berechnet.

Tabelle 21: Die Haplotypen der Gesamtstichprobe

Marker RSP2	Marker FAC476	Haplotypen	Anzahl Tiere
	100/100	2 x h/100	36
h/h	100/100 ⁻	h/100 und h/100 ⁻	44
	100 ⁻ /100 ⁻	2 x h/100 ⁻	4
	100/100	h/100 und H/100	8
h/H	100/100 ⁻	h/100 und H/100 ⁻ oder H/100 und h/100 ⁻	14
	100 ⁻ /100 ⁻	h/100 ⁻ und H/100 ⁻	3
	100/100	2 x H/100	0
H/H	100/100 ⁻	H/100 und H/100 ⁻	1
	100 ⁻ /100 ⁻	2 x H/100 ⁻	1

Die Tabelle gibt die Haplotypen in der Gesamtstichprobe wieder. Bei Doppelt heterozygoten Tieren (unterlegt) können die Haplotypen nicht eindeutig zugeordnet werden.

Die erwartete Haplotypenverteilung berechnet sich aus den Allelfrequenzen der Gesamtstichprobe (n = 222) wie folgt:

$$\begin{aligned}
 f_E(h/100) &= pr = 0,5756 & f_{Eabs.}(h/100) &= 127,7898 \\
 f_E(h/100^-) &= ps = 0,2938 & f_{Eabs.}(h/100^-) &= 65,217 \\
 f_E(H/100) &= qr = 0,0865 & f_{Eabs.}(H/100) &= 19,1964 \\
 f_E(H/100^-) &= qs = 0,0441 & f_{Eabs.}(H/100^-) &= 9,7968
 \end{aligned}$$

Für die Gesamtstichprobe können die in Tabelle 22 aufgeführten χ^2 -Werte bei den jeweiligen Haplotypenverteilungen ermittelt werden. Der niedrigste χ^2 -Wert von 0,00728 wird erzielt, bei der Annahme das vier Tiere die Haplotypen h/100 und H/100⁻ sowie zehn Tiere die Haplotypen H/100 und h/100⁻ tragen.

Tabelle 22: Haplotypenverteilung und χ^2 -Werte der Gesamtstichprobe

	h/100 und H/100 ⁻	H/100 und h/100 ⁻	χ^2
Anzahl der Tiere mit dem entsprechenden Haplotypen	0	14	2,55667
	1	13	1,38740
	2	12	0,57275
	3	11	0,11271
	4	10	0,00728
	5	9	0,25647
	6	8	0,86027
	7	7	1,81869
	8	6	3,13172
	9	5	4,79936
	10	4	6,82161
	11	3	9,19848
	12	2	11,92996
	13	1	15,01606
14	0	18,45676	

Die Tabelle gibt die χ^2 -Werte bei den jeweiligen Haplotypenverteilungen wieder. Der niedrigste χ^2 -Wert wird erreicht, wenn von den doppelt heterozygoten Tieren, vier Tiere die Haplotypen h/100 und H/100⁻ sowie zehn Tiere die Haplotypen H/100 und h/100⁻ tragen (unterlegt).

Entsprechende Rechnungen wird nun für die beiden Teilstichproben, die sich durch Einteilung in gesunde (PKD negativ) und kranke (PKD positiv) Tiere ergeben, durchgeführt. Für die Berechnung der erwarteten Haplotypenverteilung in den Subpopulationen werden die Allelfrequenzen der Gesamtstichprobe und die Größe der jeweiligen Stichprobe zugrunde gelegt. Die Beobachtungs- und Erwartungswerte, die sich aus sicher identifizierbaren Haplotypen der beiden Teilstichproben ergeben sind in Tabelle 23 dargestellt. Die Haplotypen der doppelt heterozygoten Tiere können nicht eindeutig zugeordnet werden. Die Anzahl der nicht sicher identifizierbaren Haplotypen werden im folgenden so gegenüber gestellt, dass sie eine bestmögliche Anpassung ergeben. In der Teilstichprobe PKD positiv beläuft sich die Anzahl der doppelt Heterozygoten auf fünf Tiere und in der Teilstichprobe PKD negativ auf neun Tiere.

Tabelle 23: Beobachtungs- und Erwartungswerte der sicher identifizierbaren Haplotypen beider Teilstichproben

Haplotyp	Teilstichprobe PKD positiv		Teilstichprobe PKD negativ	
	Beobachtungswerte	Erwartungswerte	Beobachtungswerte	Erwartungswerte
h/100	83	69,072	41	58,711
h/100 ⁻	24	35,256	31	29,968
H/100	3	10,380	6	8,823
H/100 ⁻	0	5,292	6	4,498

Die Tabelle gibt die Beobachtungs- und Erwartungswerte der sicher identifizierbaren Haplotypen in den beiden Teilstichproben wieder.

Für die Teilstichproben können die in den Tabellen 24 und 25 aufgeführten χ^2 -Werte bei den jeweiligen Haplotypenverteilungen ermittelt werden. In der Teilstichprobe PKD positiv wird der niedrigste χ^2 -Wert von 9,297 bei der Annahme das ein Tier die Haplotypen h/100 und H/100⁻ sowie vier Tiere die Haplotypen H/100 und h/100⁻ tragen erzielt. In der Teilstichprobe PKD negativ wird der niedrigste χ^2 -Wert von 10,984 bei der Annahme das drei Tiere die Haplotypen h/100 und H/100⁻ sowie sechs Tiere die Haplotypen H/100 und h/100⁻ tragen erzielt.

Tabelle 24: Theoretisch mögliche Haplotypenverteilungen und resultierende χ^2 -Werte in der Teilstichprobe PKD positiv

	h/100 und H/100 ⁻	H/100 und h/100 ⁻	χ^2
Anzahl der Tiere mit dem entsprechenden Haplotypen	0	5	9,75304
	1	4	9,29700
	2	3	9,49699
	3	2	10,35301
	4	1	11,86507
	5	0	14,03316

Die Tabelle gibt die χ^2 -Werte bei den jeweiligen Haplotypenverteilungen für die Teilstichprobe PKD positiv wieder. Der niedrigste χ^2 -Wert wird erreicht, wenn von den doppelt heterozygoten Tieren, ein Tier die Haplotypen h/100 und H/100⁻ sowie vier Tiere die Haplotypen H/100 und h/100⁻ tragen (unterlegt).

Tabelle 25: Theoretisch mögliche Haplotypenverteilungen und resultierende χ^2 -Werte in der Teilstichprobe PKD negativ

	h/100 und H/100 ⁻	H/100 und h/100 ⁻	χ^2
Anzahl der Tiere mit dem entsprechenden Haplotypen	0	9	13,53596
	1	8	11,91351
	2	7	11,06287
	3	6	10,98404
	4	5	11,67701
	5	4	13,14179
	6	3	15,37837
	7	2	18,38676
	8	1	22,16695
	9	0	26,71895

Die Tabelle gibt die χ^2 -Werte bei den jeweiligen Haplotypenverteilungen für die Teilstichprobe PKD negativ wieder. Der niedrigste χ^2 -Wert wird erreicht, wenn von den doppelt heterozygoten Tieren, drei Tiere die Haplotypen h/100 und H/100⁻ sowie sechs Tiere die Haplotypen H/100 und h/100⁻ tragen (unterlegt).

In der Gesamtstichprobe existiert eine Aufteilung der doppelt heterozygoten Tiere in Haplotypen in der Art, dass eine Anpassung an die Erwartungswerte unter Equilibrium möglich ist. In den beiden Teilstichproben (PKD positiv und PKD negativ) ist eine Anpassung an die Erwartungswerte unter Equilibrium und Unabhängigkeit vom Krankheitsgenort nicht mehr möglich. Diese Tatsache kann als deutlicher Hinweis auf eine Assoziation der beiden Marker (RSP2 und FCA 476) mit dem Polyzystischen Syndrom gewertet werden.

5.6 Kopplung des Polyzystischen Syndroms mit dem Markerlokus FCA 476

Die Bedeutung eines Markers für die Vererbbarkeit einer Erkrankung basiert auf Studien zur Identifizierung des Erbgangs (Segregation) anhand von Familienuntersuchungen und der Untersuchung einer möglichen Kopplung zwischen Marker und Krankheitsgen bzw. allel. Grundlage hierfür ist die Tatsache, dass sämtliche Gene eines Chromosoms eine Kopplungsgruppe darstellen und so als Einheit während der Meiose an die Nachkommen weitergegeben werden. Dieses Kopplungsverhältnis wird durch Rekombinationsvorgänge sogenanntes *crossing over* gebrochen. Die genetische Distanz zwischen zwei Loci wird in centiMorgans (cM), zu Ehren von T.H. Morgan der 1910 den Prozeß des *crossing overs* entdeckte, angegeben. Da die Wahrscheinlichkeit eines *crossing over* Prozesses größer ist je weiter zwei Loci von einander entfernt auf einem Chromosom liegen kann anhand der Rekombinationsfrequenz beurteilt werden ob zwei Loci gekoppelt oder unabhängig voneinander vererbt werden.

Bei einer Distanz von 50cM und mehr spricht man von einer unabhängigen (unlinked) Vererbung, da in diesem Fall die Rekombinationsfrequenz 50% beträgt und genauso groß ist als würden die zwei Loci auf verschiedenen Chromosomen lokalisiert sein. Um eine Aussage darüber treffen zu können ob ein beobachtetes Ergebnis signifikant oder durch Zufall bedingt ist bedient man bei der Kopplungsanalyse einer Standard Methode, dem LOD Wert. LOD Werte sind ein statistisches Maß für das Vorhandensein einer Kopplung (Strachan et al., 1996).

Die Stärke einer Kopplung kann anhand der Rekombinationsfraktion θ beurteilt werden, wobei der Wert $\theta = 0$ einer absoluten Kopplung entspricht, wohingegen eine unabhängige Segregation einen Wert von $\theta = 0,5$ anzeigt.

Eine Rekombinationsfrequenz von 1% entspricht einer genetischen Distanz von 1 centiMorgen (cM), was etwa einer Distanz von 1000 Kilobasenpaaren (kbp) entspricht.

Bei der Analyse von Stammbäumen wird zunächst eine Wahrscheinlichkeitsanalyse durchgeführt. Für eine gegebene Rekombinationsfraktion θ wird die Wahrscheinlichkeit $L(\theta)$ bestimmt und im Anschluß wird getestet ob diese Wahrscheinlichkeit signifikant von $L(0,5)$, also einer Abwesenheit einer Kopplung, abweicht. Dies wird als Kopplungs Quotient ausgedrückt (*engl.: odds ratio of linkage*). Der Logarithmus dieses Quotienten wird als Lod score ($Z(\theta)$) bezeichnet. Allgemein akzeptiert man einem LOD Wert von > 3 als einen Beweis für Kopplung, da in diesem Fall die Wahrscheinlichkeit einer Kopplung 1000 mal größer ist als die Wahrscheinlichkeit nicht gekoppelt. Im Gegensatz dazu gilt ein LOD Wert von < -2 als Beweis für nicht gekoppelt. Um ein signifikantes Ergebnis zu erhalten bedarf es der Betrachtung einer ausreichenden Anzahl an Meiosen. Hierzu werden die LOD Werte von verschiedenen Familien addiert. (Jorde et al., 2000; Strachan et al., 1996)

Um eine Kopplung des Allels 100 des Polymorphismus am Markerlokus FCA 476 mit dem positiven PKD Status aufzuzeigen werden im folgenden verschiedene Familien auf ihre LOD Werte untersucht. Zugrunde gelegt wird hierbei die Hypothese, dass der Genort welcher die krankheitsauslösende Mutation trägt (im folgenden bezeichnet mit K) mit dem Allel 100 des Polymorphismus am Markerlokus FCA 476 gekoppelt ist und das es sich beim Polyzystischen Syndrom um einen dominanten Erbgang handelt. Das korrespondierende, von der krankheitsauslösenden Mutation nicht betroffene Allel wird mit G bezeichnet.

Zu diesem Zweck wurden aus den Daten der angelegten Datenbank die Familienverhältnisse der einzelnen Tiere ermittelt und Stammbäume erstellt. Voraussetzung für die Erstellung der Stammbäume war es, dass der PKD Status sowie der Genotyp des Polymorphismus am Markerlokus FCA 476 der einzelnen Mitglieder bekannt war.

In dem Stammbaum Nummer eins (s. Abb. 44) können insgesamt elf Nachkommen beobachtet werden.

Der männliche Nachkomme Nummer 2080 mußte das FCA 476 Allel 100 von seinem Vater erhalten haben, da nur er dieses Allel weitergeben kann. Zudem mußte er vom Vater das PKD Krankheitsgen K geerbt haben, da die Mutter negativ für PKD ist und daher das PKD Krankheitsgen K nicht trägt.

Von seiner Mutter bekam der Nachkomme (2080) das Allel 99 zusammen mit dem Wildtyp Allel G. Dieser betroffene Nachkomme hat also die Haplotypen K/100 und G/99

Zehn der elf Nachkommen sind informativ und nur diese gehen in die Berechnung des LOD Wertes ein.

Unter der Hypothese einer absoluten Kopplung ($\theta = 0$) müssen alle Nachkommen die den Haplotyp K100 von dem Vater geerbt haben PKD positiv sein.

Die Wahrscheinlichkeit diesen Haplotyp vom Vater zu erben ist $1/2$. Bei einem angenommenen $\theta = 0$ und zehn Nachkommen ist die Wahrscheinlichkeit die Genotypen wie aufgezeigt zu beobachten $1/2^{10}$ oder $1/1024$.

Unter der Annahme das keine Kopplung vorliegt ($\theta = 0,5$) kann der Vater alle vier Kombinationen K100, K102, G100, G102 mit der gleichen Wahrscheinlichkeit von $1/4$ vererben.

Die Wahrscheinlichkeit die Genotypen so zu beobachten, wenn keine Kopplung vorliegt ($\theta = 0,5$) ist dann $1/4^{10} = 1/1048576$.

Die Likelihood Ratio ist der Quotient aus der Likelihood bei $\theta = 0$ und der Likelihood bei $\theta = 0,5$. Die Likelihood Ratio beträgt demnach $1/1024 : 1/1048576 = 1024$.

Der Logarithmus von 1024 also der LOD Wert beträgt demnach 3,0.

Entsprechend berechnete sich der Likelihood Wert bei einer Rekombinationswahrscheinlichkeit (θ) von $\theta = 0,1$ nach der Formel (4).

$$(4) \quad \text{Likelihood} = \frac{1}{2} (1 - \theta)^{NR} \times \theta^R$$

wobei NR gleich die Anzahl der nicht Rekombinanten und R gleich der Anzahl der Rekombinanten ist.

Für die Familie des Stammbaum eins gilt dann bei $\theta = 0,1$:

$$\frac{1}{2} (1 - 0,1)^{10} \times 0,1^0 = 3,41^{-04} .$$

Die Likelihood Ratio beträgt dann $3,41^{-04} : 1/1048576 = 357,47$.

Der Logarithmus von 357,47 also der LOD Wert beträgt dann 2,55.

Bei einer Rekombinationswahrscheinlichkeit (θ) von $\theta = 0,2$ ist die Likelihood dann:

$$\frac{1}{2} (1 - 0,2)^{10} \times 0,2^0 = 1,05^{-04} .$$

Die Likelihood Ratio beträgt dann $1,05^{-04} : 1/1048576 = 109,95$.

Der Logarithmus von 109,95 also der LOD Wert beträgt dann 2,04.

Entsprechend gilt für eine Rekombinationswahrscheinlichkeit (θ) von $\theta = 0,3$:

$$\frac{1}{2} (1 - 0,3)^{10} \times 0,3^0 = 2,76^{-05}.$$

Die Likelihood Ratio beträgt dann $2,76^{-05} : 1/1048576 = 28,93$.

Der Logarithmus von 28,93 also der LOD Wert beträgt dann 1,46.

Für eine Rekombinationswahrscheinlichkeit von $\theta = 0,4$ gilt:

$$\frac{1}{2} (1 - 0,4)^{10} \times 0,4^0 = 5,91^{-06}.$$

Die Likelihood Ratio beträgt dann $5,91^{-06} : 1/1048576 = 6,19$.

Der Logarithmus von 6,19 also der LOD Wert beträgt dann 0,79.

Für eine Rekombinationswahrscheinlichkeit von $\theta = 0,5$ gilt:

$$\frac{1}{2} (1 - 0,5)^{10} \times 0,5^0 = 9,54^{-07}.$$

Die Likelihood Ratio beträgt dann $9,54^{-07} : 1/1048576 = 1$.

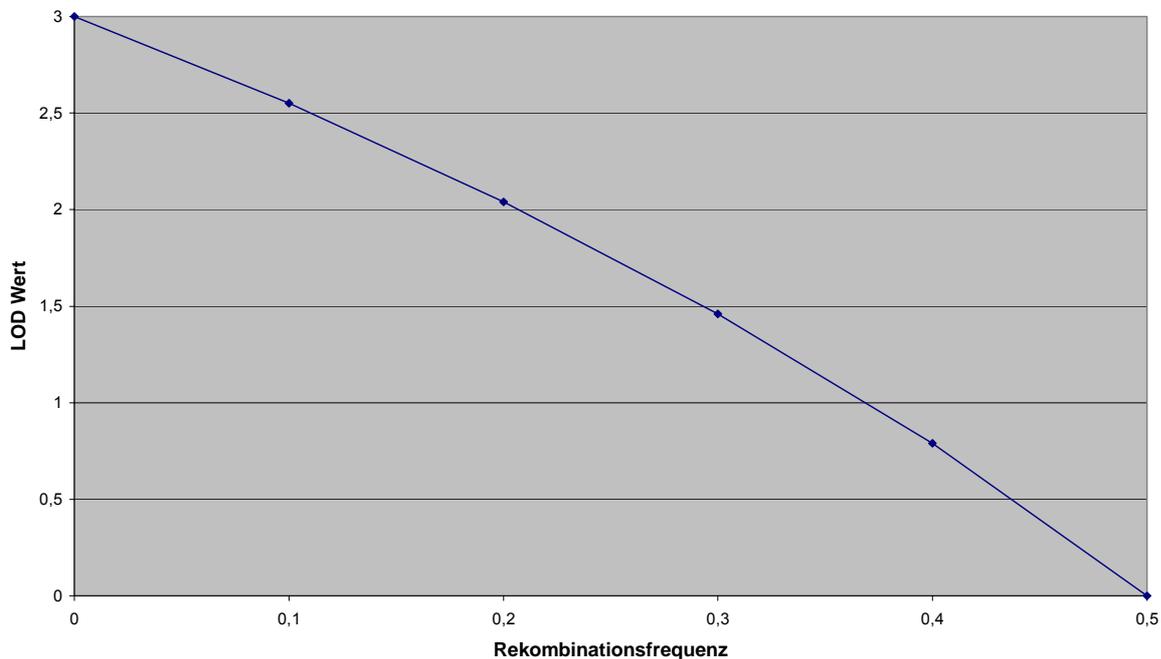
Der Logarithmus von 1 also der LOD Wert beträgt dann 0.

Die berechneten LOD Werte gelten nur bei einer Kopplung des das Krankheitsgen (K) mit dem Allel 100 des Polymorphismus am Markerlokus FCA 476.

Da die Kopplungsphase jedoch nicht bekannt ist muß auch die Möglichkeit in Betracht gezogen werden, dass das Krankheitsgen K mit dem Allel 102 des Polymorphismus am Markerlokus FCA 476 gekoppelt ist. Im Stammbaum eins lassen sich, unter dieser angenommenen zweiten Kopplungsphase (Phase 2) insgesamt zehn rekombinante Nachkommen ermitteln.

Bei unbekannter Kopplungsphase werden die Wahrscheinlichkeiten beider Kopplungsmöglichkeiten addiert.

Abb. 41: LOD Werte für Stammbaum eins Phase 1



Der LOD Wert (y Achse) wurde gegen die Rekombinationsfrequenz (x Achse) aufgetragen, um die wahrscheinlichste Rekombinationsfrequenz zu ermitteln. Die LOD Werte gelten für den Stammbaum 1 und sind für die Phase 1 (Kopplung Allel K mit Allel 100) berechnet.

Dies bedeutet für die Berechnung des Likelihood Wertes nach der Formel (5):

$$(5) \quad \text{Likelihood} = \left[\frac{1}{2} (1 - \theta)^{NR1} \times \theta^{R1} \right] + \left[\frac{1}{2} (1 - \theta)^{NR2} \times \theta^{R2} \right]$$

wobei NR gleich die Anzahl der nicht Rekombinanten und R gleich der Anzahl der Rekombinanten ist. 1 steht für die Kopplungsphase eins und 2 steht für die Kopplungsphase zwei.

Wie zuvor beschrieben wird aus der Likelihood die Likelihood Ratio und der LOD Wert berechnet. Unter der Berücksichtigung der Kopplungsphase eins und der Kopplungsphase zwei ergeben sich für die verschiedenen Rekombinationsfrequenzen folgende LOD Werte:

Der LOD Wert bei $\theta = 0$ beträgt 3,0

Der LOD Wert bei $\theta = 0,1$ beträgt 2,55

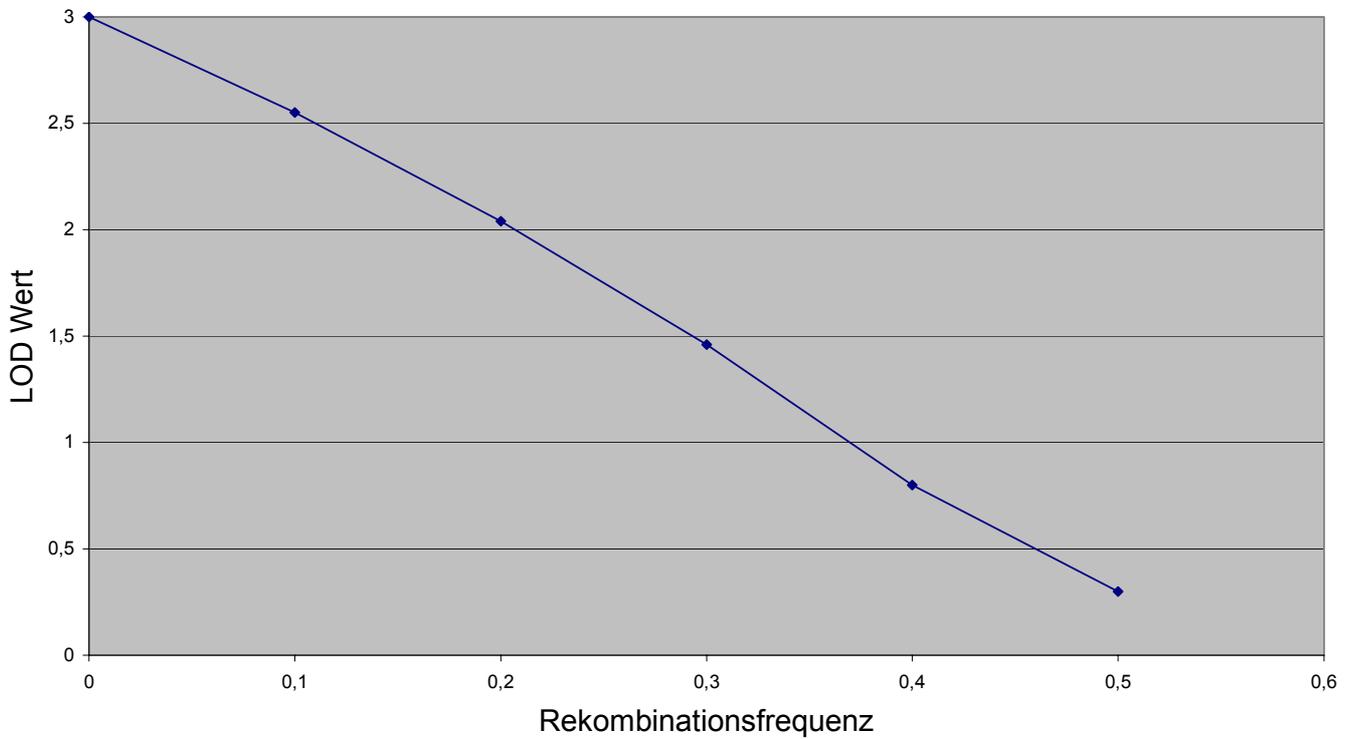
Der LOD Wert bei $\theta = 0,2$ beträgt 2,04

Der LOD Wert bei $\theta = 0,3$ beträgt 1,46

Der LOD Wert bei $\theta = 0,4$ beträgt 0,8

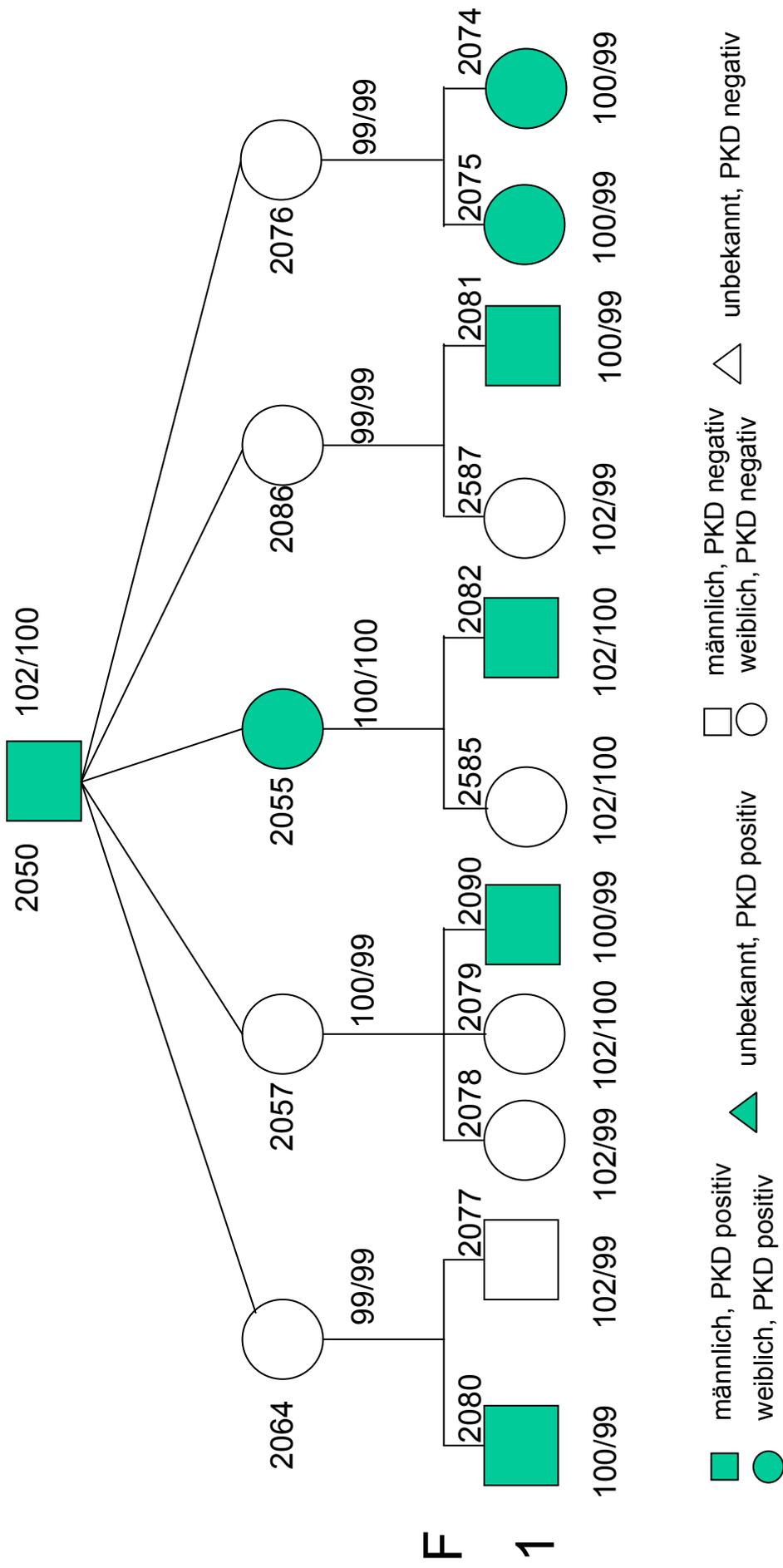
Der LOD Wert bei $\theta = 0,5$ beträgt 0,3

Abb. 42: LOD Werte Stammbaum 1 Phase 1 und 2



Der LOD Wert (y Achse) wurde gegen die Rekombinationsfrequenz (x Achse) aufgetragen, um die wahrscheinlichste Rekombinationsfrequenz zu ermitteln. Die LOD Werte gelten für den Stammbaum 1 und sind für die beiden Phasen 1 (Kopplung Allel K mit Allel 100) und 2 (Kopplung Allel K mit Allel 102) berechnet.

Abb. 43: Stammbaum 1



Bei der Auswertung der Familienverhältnisse konnte dieser Stammbaum 1 ausfindig gemacht werden. Die Zahl rechts neben den Symbolen bezeichnet die interne Kennnummer des jeweiligen Individuums. Unterhalb der Symbole ist zum einen der Genotyp für den Restriktionspolymorphismus und zum anderen für den Polymorphismus am Markerlocus FCA 476 angegeben. Der PKD Status des einzelnen Tieres ist farblich gekennzeichnet.

Bei Betrachtung des Stammbaums Nummer zwei (s. Abb. 47), unter der Hypothese das Markerallel 100 sei mit dem die krankheitsauslösende Mutation tragendem Allel K gekoppelt, müssen alle Nachkommen die den Haplotyp K/100 geerbt haben PKD positiv sein. Der Vater 2042 hat die Allele 101/100 und ist positiv für PKD somit sind seine Haplotypen G/101 und K/100. Die erste Mutter 2000 trägt die Allele 102/100 und ist negativ für PKD somit sind ihre Haplotypen G/102 und G/100.

Beide Nachkommen haben den Haplotyp K/100 vom Vater und G/100 von der Mutter geerbt. Wie zu erwarten sind beide PKD positiv.

Von den insgesamt sechs Nachkommen dieser Familie sind drei informativ.

Bei einer angenommenen Rekombinationsfrequenz von $\theta = 0$ und insgesamt drei Nachkommen in dieser Familie ist die Wahrscheinlichkeit die Genotypen wie aufgezeigt zu beobachten $1/2^3$ oder $1/8$.

Unter der Annahme das keine Kopplung vorliegt ($\theta = 0,5$) kann der Vater alle vier Kombinationen K/100, K/101, G/100, G/101 mit der gleichen Wahrscheinlichkeit von $1/4$ vererben.

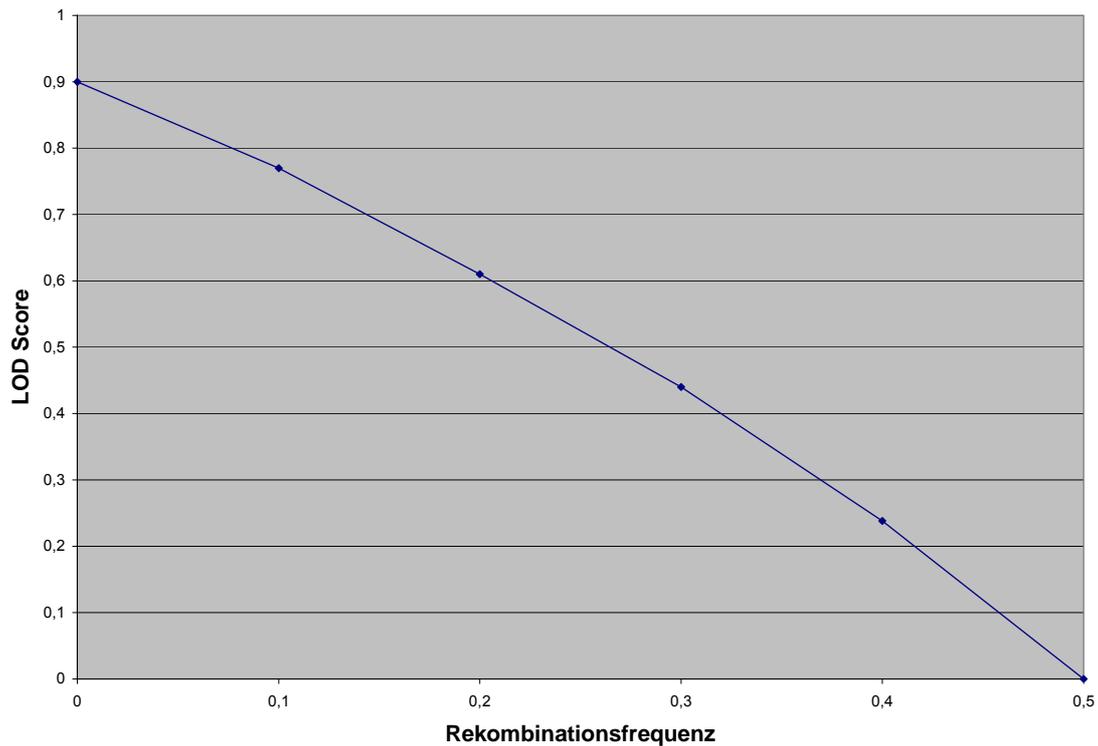
Die Wahrscheinlichkeit die Genotypen so zu beobachten, wenn keine Kopplung vorliegt ($\theta = 0,5$) wäre dann $1/4^3 = 1/64$.

Die Likelihood Ratio beträgt dann $1/8 : 1/64 = 8$. Der Logarithmus von 8 also der LOD Wert beträgt dann 0,9.

Entsprechend berechnen sich der Likelihood Werte, bei den verschiedenen Rekombinationswahrscheinlichkeiten (θ) nach der Formel (4). Mit Hilfe der Likelihood Werte lassen sich die folgenden LOD Werte ermitteln:

für $\theta = 0$	0,9
für $\theta = 0,1$	0,77
für $\theta = 0,2$	0,61
für $\theta = 0,3$	0,44
für $\theta = 0,4$	0,24
für $\theta = 0,5$	0

Abb. 44: LOD Werte für Stammbaum zwei Phase 1



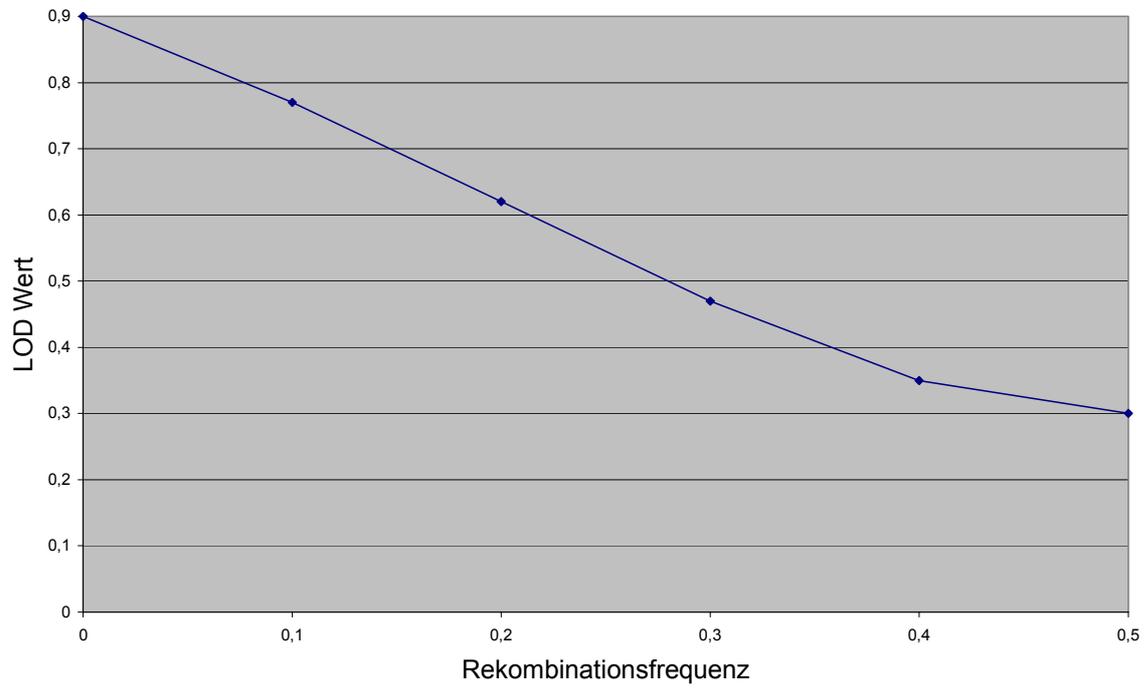
Der LOD Wert (y Achse) wurde gegen die Rekombinationsfrequenz (x Achse) aufgetragen, um die wahrscheinlichste Rekombinationsfrequenz zu ermitteln. Die LOD Werte gelten für den Stammbaum 2 und sind für die Phase 1(Kopplung Allel K mit Allel 100) berechnet.

Da auch in diesem Fall die Kopplungsphase nicht bekannt ist muß auch hier die Möglichkeit in Betracht gezogen werden, dass das Krankheitsgen (K) mit dem Allel 101 des Polymorphismus am Markerlokus FCA 476 gekoppelt ist. Somit ergeben sich unter Berücksichtigung dieser zweiten möglichen Kopplungsphase insgesamt drei rekombinante Nachkommen.

Dies bedeutet für die Berechnung der LOD Werte nach der Formel (5):

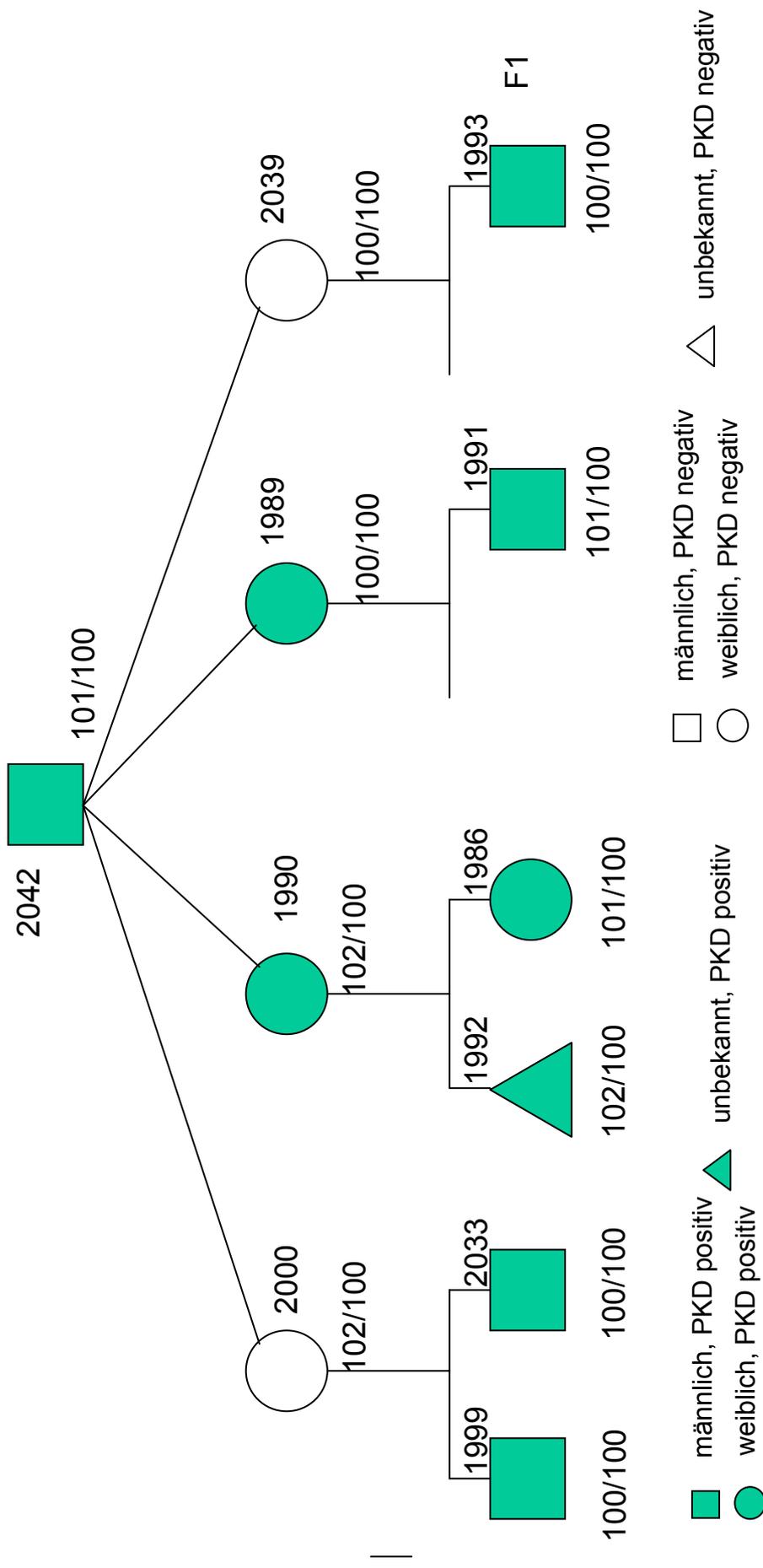
- für $\theta = 0$ 0,9
- für $\theta = 0,1$ 0,77
- für $\theta = 0,2$ 0,62
- für $\theta = 0,3$ 0,47
- für $\theta = 0,4$ 0,35
- für $\theta = 0,5$ 0,3

Abb. 45: LOD Werte Stammbaum 2 Phase 1 und 2



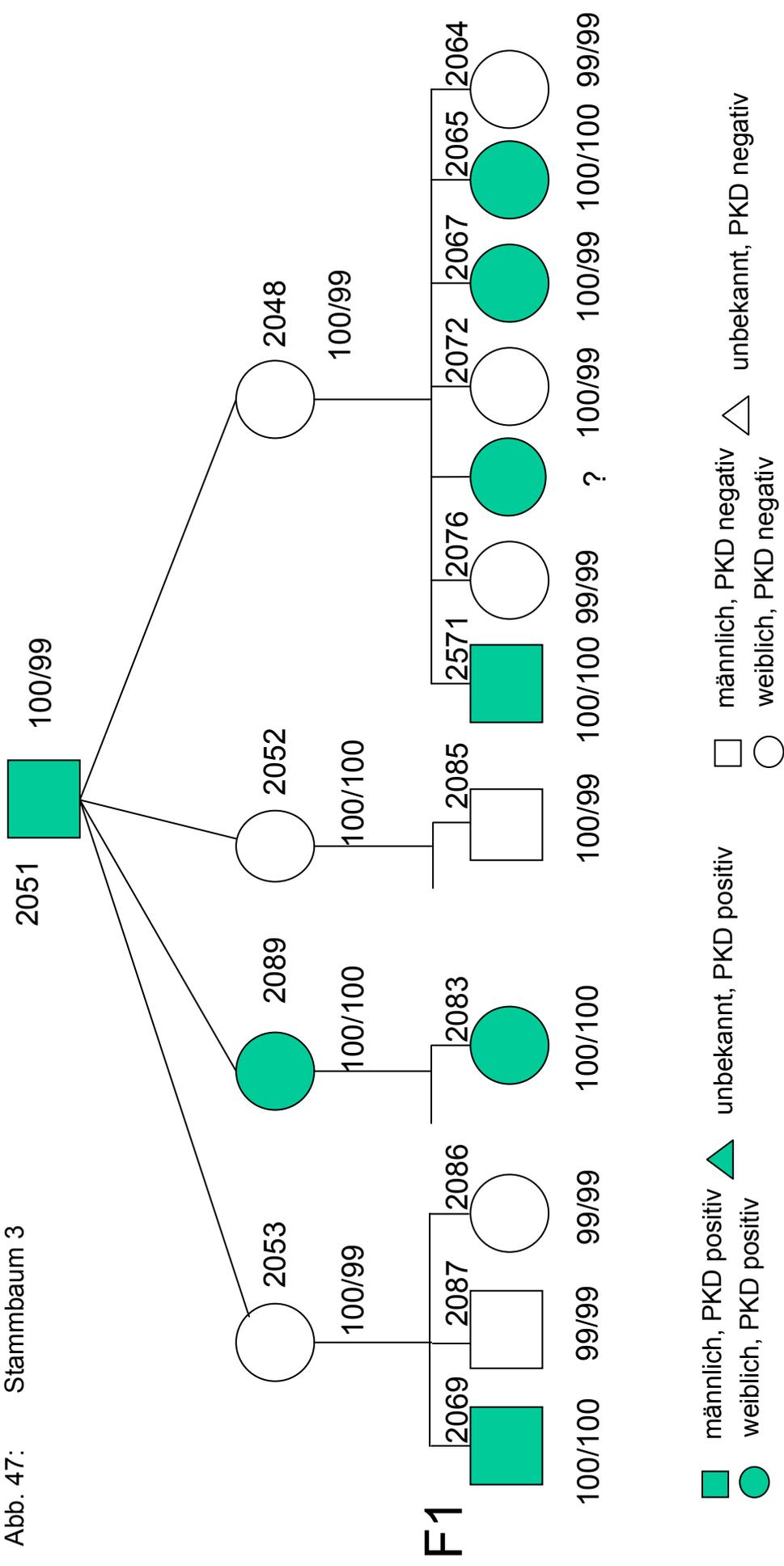
Der LOD Wert (y Achse) wurde gegen die Rekombinationsfrequenz (x Achse) aufgetragen, um die wahrscheinlichste Rekombinationsfrequenz zu ermitteln. Die LOD Werte gelten für den Stammbaum 2 und sind für die beiden Phasen 1 (Kopplung Allel K mit Allel 100) und 2 (Kopplung Allel K mit Allel 102) berechnet.

Abb. 46: Stammbaum 2



Bei der Auswertung der Familienverhältnisse konnte dieser Stammbaum 1 ausfindig gemacht werden. Die Zahl rechts neben den Symbolen bezeichnet die interne Kennnummer des jeweiligen Individuums. Unterhalb der Symbole ist zum einen der Genotyp für den Restriktionspolymorphismus und zum anderen für den Polymorphismus am Markerlokus FCA 476 angegeben. Der PKD Status des einzelnen Tieres ist farblich gekennzeichnet.

Abb. 47: Stammbaum 3



Bei der Auswertung der Familienverhältnisse konnte dieser Stammbaum 1 ausfindig gemacht werden. Die Zahl rechts neben den Symbolen bezeichnet die interne Kennnummer des jeweiligen Individuums. Unterhalb der Symbole ist zum einen der Genotyp für den Restriktionspolymorphismus und zum anderen für den Polymorphismus am Markerlokus FCA 476 angegeben. Der PKD Status des einzelnen Tieres ist farblich gekennzeichnet.

Im Stammbaum Nummer drei (s. Abb. 48) besitzt der Vater 2051 unter der zuvor aufgestellten Hypothese, die Haplotypen K/100 sowie G/99. Auch hier müssen alle Nachkommen PKD positiv sein, wenn sie den Haplotyp K/100 bzw. PKD negativ sein wenn sie den Haplotyp G/99 vom Vater geerbt haben. Das Vatertier wurde in dieser Familie mit drei PKD negativen weiblichen Tieren gepaart woraus insgesamt elf Nachkommen hervorgehen. Von einem dieser Nachkommen stand uns keine Blutprobe zur Verfügung. Die zehn übrigen Nachkommen sind nur dann PKD positiv, wenn sie den Haplotyp K/100 vom Vater geerbt haben.

Aus dieser Familie gehen acht informative Nachkommen hervor.

Bei einer angenommenen Kopplung ($\theta = 0$) und insgesamt acht Nachkommen in dieser Familie ist die Wahrscheinlichkeit die Genotypen wie aufgezeigt zu beobachten $1/2^8$ oder $1/256$.

Unter der Annahme das keine Kopplung vorliegt ($\theta = 0,5$) kann der Vater alle vier Kombinationen K/100, K/101, G/100, G/101 mit der gleichen Wahrscheinlichkeit von $1/4$ vererben.

Die Wahrscheinlichkeit die Genotypen so zu beobachten, wenn keine Kopplung vorliegt ($\theta = 0,5$) wäre dann $1/4^8 = 1/65536$.

Die Likelihood Ratio beträgt dann $1/256 : 1/65536 = 256$. Der Logarithmus von 256 also der LOD Wert beträgt dann 2,41.

Entsprechend berechnen sich der Likelihood Werte, bei den verschiedenen Rekombinationswahrscheinlichkeiten (θ) nach der Formel (4). Mit Hilfe der Likelihood Werte lassen sich die folgenden LOD Werte ermitteln:

für $\theta = 0$	2,41
für $\theta = 0,1$	2,04
für $\theta = 0,2$	1,63
für $\theta = 0,3$	1,17
für $\theta = 0,4$	0,63
für $\theta = 0,5$	0

Da jedoch auch in diesem Fall die Kopplungsphase nicht bekannt ist muß auch hier die Möglichkeit in Betracht gezogen werden, daß das Krankheitsgen (K) mit dem Allel 99 des Polymorphismus am Markerloкус FCA 476 gekoppelt ist. Unter dieser zweiten Kopplungsphase lassen sich acht rekombinante Nachkommen ermitteln.

Bei unbekannter Kopplungsphase werden die Wahrscheinlichkeiten beider Kopplungsmöglichkeiten addiert.

Dies bedeutet für die Berechnung der LOD Werte mit der Formel (5):

für $\theta = 0$ 2,41

für $\theta = 0,1$ 2,04

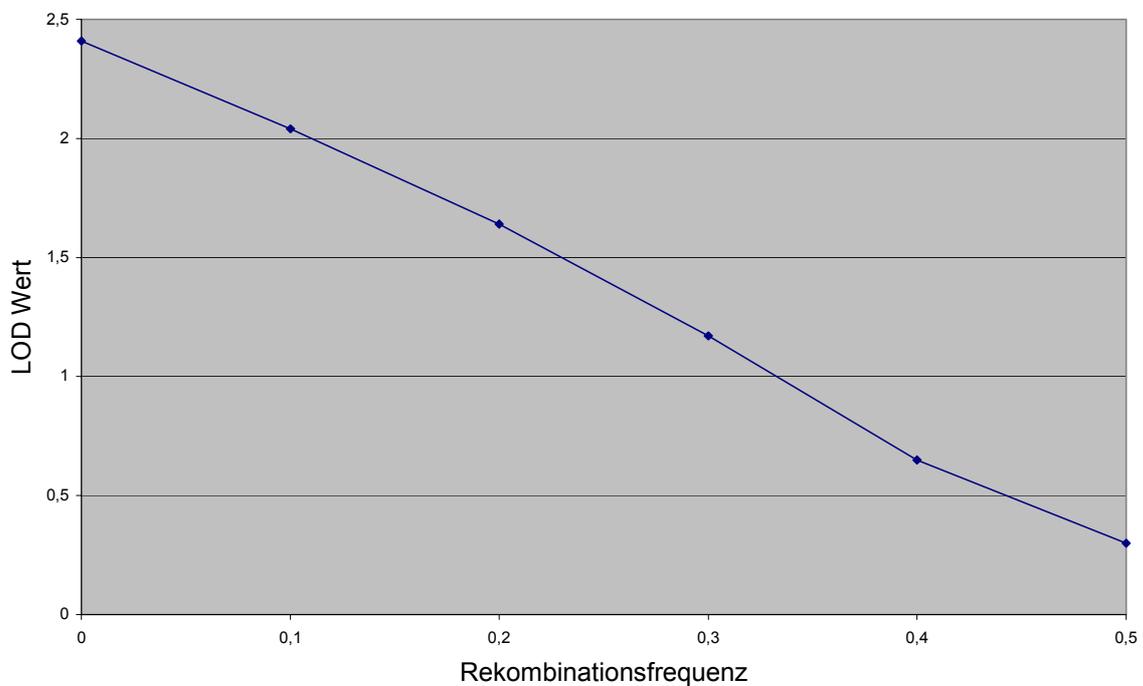
für $\theta = 0,2$ 1,64

für $\theta = 0,3$ 1,17

für $\theta = 0,4$ 0,65

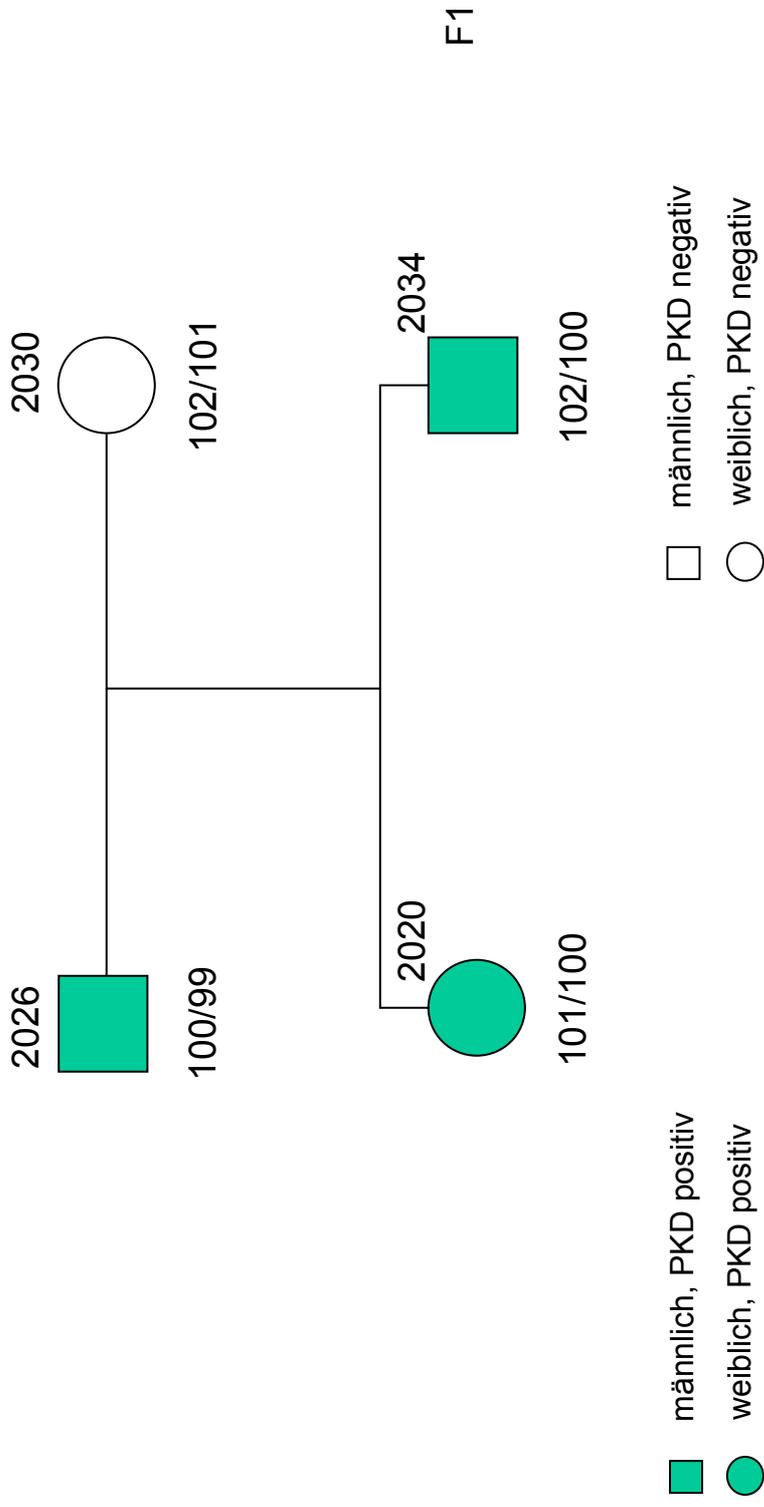
für $\theta = 0,5$ 0,3

Abb. 48: LOD Werte Stammbaum 3 Phase 1 und 2



Der LOD Wert (y Achse) wurde gegen die Rekombinationsfrequenz (x Achse) aufgetragen, um die wahrscheinlichste Rekombinationsfrequenz zu ermitteln. Die LOD Werte gelten für den Stammbaum 2 und sind für die beiden Phasen 1 (Kopplung Allel K mit Allel 100) und 2 (Kopplung Allel K mit Allel 102) berechnet.

Abb. 49: Stammbaum 4



Bei der Auswertung der Familienverhältnisse konnte dieser Stammbaum 1 ausfindig gemacht werden. Die Zahl rechts neben den Symbolen bezeichnet die interne Kennnummer des jeweiligen Individuums. Unterhalb der Symbole ist zum einen der Genotyp für den Restriktionspolymorphismus und zum anderen für den Polymorphismus am Markerlokus FCA 476 angegeben. Der PKD Status des einzelnen Tieres ist farblich gekennzeichnet.

Aus dem Stammbaum vier (s. Abb. 50) gehen zwei informative Nachkommen hervor. Bei einem angenommenen $\theta = 0$ und insgesamt zwei Nachkommen in dieser Familie ist die Wahrscheinlichkeit die Genotypen wie aufgezeigt zu beobachten $1/2^2$ oder $1/4$. Unter der Annahme das keine Kopplung vorliegt $\theta = 0,5$ kann der Vater alle vier Kombinationen K/100, K/99, G/100, G/99 mit der gleichen Wahrscheinlichkeit von $1/4$ vererben.

Die Wahrscheinlichkeit die Genotypen so zu beobachten wenn keine Kopplung vorliegt $\theta = 0,5$ wäre dann $1/4^2 = 1/16$.

Die Likelyhood Ratio beträgt dann $1/4 : 1/16 = 4$. Der Logarithmus von 4 also der LOD Wert beträgt dann 0,6.

Entsprechend berechnet sich der LOD Wert bei den entsprechenden Rekombinationswahrscheinlichkeiten mit der Formel (4):

für $\theta = 0$	0,6
für $\theta = 0,1$	0,51
für $\theta = 0,2$	0,41
für $\theta = 0,3$	0,29
für $\theta = 0,4$	0,16
für $\theta = 0,5$	0

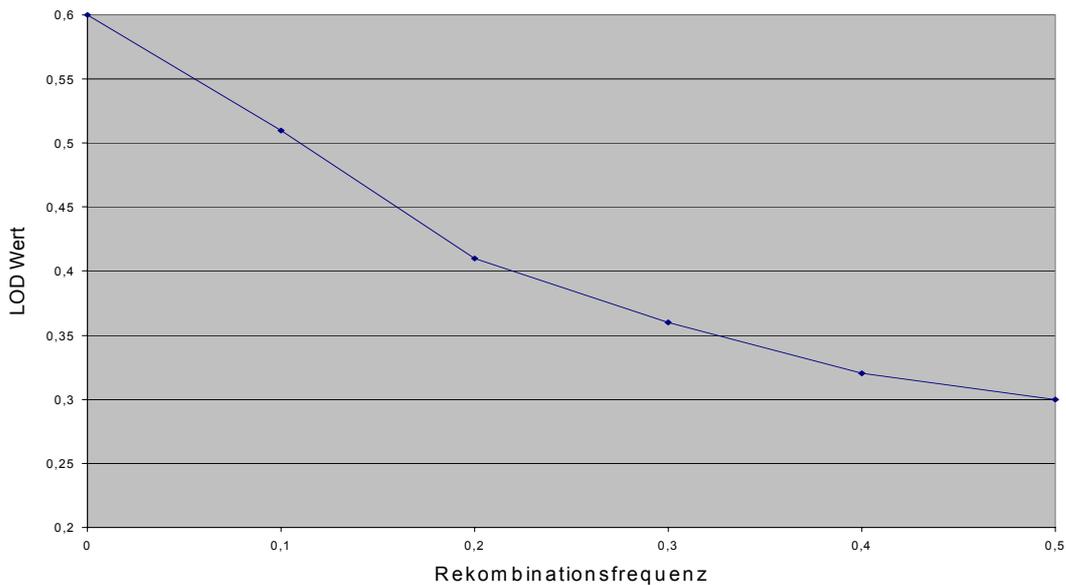
Da auch in diesem Fall die Kopplungsphase nicht bekannt ist muß zusätzlich die Möglichkeit in Betracht gezogen werden, dass das Krankheitsgen (K) mit dem Allel 99 des Polymorphismus am Markerloкус FCA 476 gekoppelt ist. Unter dieser zweiten Kopplungsphase lassen sich zwei Rekombinante Nachkommen beobachten.

Bei unbekannter Kopplungsphase werden die Wahrscheinlichkeiten beider Kopplungsmöglichkeiten addiert.

Dies bedeutet für die Berechnung der LOD Werte nach der Formel (5):

für $\theta = 0$	0,6
für $\theta = 0,1$	0,51
für $\theta = 0,2$	0,41
für $\theta = 0,3$	0,36
für $\theta = 0,4$	0,32
für $\theta = 0,5$	0,3

Abb. 50: LOD Werte Stammbaum 4 Phase 1 und 2



Der LOD Wert (y Achse) wurde gegen die Rekombinationsfrequenz (x Achse) aufgetragen, um die wahrscheinlichste Rekombinationsfrequenz zu ermitteln. Die LOD Werte gelten für den Stammbaum 2 und sind für die beiden Phasen 1 (Kopplung Allel K mit Allel 100) und 2 (Kopplung Allel K mit Allel 102) berechnet.

Die LOD Werte von verschiedenen Familien können addiert werden. (Jorde und Carey, 2000; Strachan und Read, 1996). Hieraus ergibt sich ein LOD Wert von 6,91 bei einem $\theta = 0$ unter der Berücksichtigung beider möglichen Kopplungsphasen (s. Tab. 26). Dies bedeutet dass eine Kopplung zwischen dem Allel 100 des Polymorphismus am Markerlokus FCA 476 und der Erkrankung (Polyzystisches Syndrom) vorliegt.

Tabelle 26: Summe der LOD Werte bei unbekannter Kopplungsphase

θ	0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5
Nr.						
Stammbaum 1	3	2,55	2,04	1,46	0,8	0,3
Stammbaum 2	0,9	0,77	0,62	0,47	0,35	0,3
Stammbaum 3	2,41	2,04	1,64	1,17	0,65	0,3
Stammbaum 4	0,6	0,51	0,41	0,36	0,32	0,3
Summe	6,91	5,87	4,71	3,46	2,12	1,2

Die LOD Werte aus den einzelnen Stammbäume werden addiert. Hierfür werden die LOD Werte bei den einzelnen Rekombinationsfrequenzen unter der Berücksichtigung beider möglichen Kopplungsphasen ermittelt. Die Rekombinationsfrequenz mit dem größten LOD Wert gilt als die Wahrscheinlichste.

6 Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es, eine Kopplung des Krankheitsgenortes für das Polyzystische Syndrom der Katze mit dem Marker FCA 476 nachzuweisen und zu überprüfen ob PKD1 als das verursachende Gen für das Polyzystische Syndrom verantwortlich ist. Bisher war nicht bekannt, welches Gen bei der Katze ursächlich für das Polyzystische Syndrom verantwortlich ist. DiBartola und Mitarbeiter wiesen eine Kopplung des feline PKD1 Gens mit dem Mikrosatelliten FCA 476 nach (DiBartola et al., 1999). Von Menotti-Raymond und Mitarbeitern konnte dieser Mikrosatellit FCA 476 dem Chromosom E3 der Katze zugeordnet werden (Menotti-Raymond et al., 1999). Die Frage, ob es sich bei dem verantwortlichen Gen für das Polyzystische Syndrom um das feline PKD1 Gen handelt, blieb jedoch offen. Bei der humanen ADPKD sind insgesamt drei Gene die für die Erkrankung verantwortlich sein können bekannt: PKD1 (European Polycystic Kidney Disease Consortium, 1994; Burn et al., 1995; Hughes et al., 1995; International Polycystic Kidney Disease Consortium, 1995), PKD2 (Mochizuki et al., 1996; Schneider et al., 1996) und PKD3 (Daoust et al., 1995; Turco et al., 1996). Das humane PKD2 Gen liegt auf dem langen Arm von Chromosom 4 (Mochizuki et al., 1996; Schneider et al., 1996). Konservierte Gengruppen des humanen Chromosom 4 sind auf dem feline Chromosom B1 zu finden (Menotti-Raymond et al., 1999), so dass Chromosom B1 eine mögliche Lage für das feline PKD2 Gen darstellt.

Für die Suche nach der krankheitsauslösende Mutation, die für das Polyzystische Syndrom verantwortlichen ist, ist es von entscheidender Bedeutung zu klären, welches der beiden Kandidatengene mit der Erkrankung gekoppelt ist.

Ziel dieser Studie war es zu ergründen, ob eine Kopplung des Polyzystischen Syndroms mit dem feline PKD1 Gen vorliegt. Da in 85-90% der Fälle die Erkrankung beim Menschen durch eine Mutation im PKD1 Gen hervorgerufen wird (European Polycystic Kidney Disease Consortium, 1994), lag es nahe, sich auf die Untersuchung des feline Kandidatengen PKD1 zu konzentrieren.

6.1 Beschreibung der Stichprobe

In der Stichprobe aus der vorliegenden Arbeit waren 43% der insgesamt 334 Tiere mit bekanntem PKD Status positiv für das Polyzystische Syndrom. Dieser hier ermittelte Wert lag im Rahmen der Werte, die in der Literatur angegeben werden.

So waren in den Vereinigten Staaten von 4000 per Ultraschall untersuchten Katzen 37% PKD positiv (Biller, 2000). Von 192 untersuchten Perserkatzen an der Tierärztlichen Hochschule in Hannover wiesen 47 Tiere ($\cong 24,5\%$) multiple Zysten auf (Meyer-Lindberg et al., 1998/99). Bei einer Studie in Frankreich wurden 220 Perserkatzen untersucht von denen 41,8 % PKD positiv waren (Barthez et al., 2003) und bei einer vergleichbaren Studie aus England wurden 49,2 % der 132 untersuchten Perserkatzen als PKD positiv identifiziert (Cannon et al., 2001). Auch auf der PKD Summary Page (www.indyweb.net/~lucky/stats.html), die Untersuchungsergebnisse aus verschiedenen Ländern beinhaltet, rangieren die Werte für PKD positive Tiere zwischen 20% und 60%. Insgesamt sind von den dort eingetragenen Perserkatzen 39% PKD positiv.

Auch wenn der in der vorliegenden Studie ermittelte Anteil von 43% positiver Katzen mit den Angaben aus anderen Länder übereinstimmt, so muss bei der Beurteilung des Ergebnisses hinsichtlich der Repräsentativität für die Perserkatzenpopulation berücksichtigt werden, dass die untersuchten Katzen der Stichprobe häufig aus größeren Zuchtställen kamen. Da die Züchter meist nur wenige männliche Zuchttiere besitzen, ist es offensichtlich, dass im Fall eines positiven Zuchtkaters in diesem Zuchtstall vermehrt PKD positive Nachkommen zu erwarten sind. Wurden die Elterntiere PKD negativ getestet, so wurden deren Nachkommen erst gar nicht mehr in der Klinik vorgestellt. Darüberhinaus waren die Besitzer positiver Tiere eher dazu bereit der Blutprobenentnahme zuzustimmen. Deshalb sollte man für die Gesamtpopulation von einem geringfügig niedrigeren Wert ausgehen.

Die geschlechtsbezogene Auswertung ergab 48,7% PKD positive männliche ($n = 115$) und 37,5% positive weibliche ($n = 200$) Tiere. Der größere Anteil an weiblichen Tieren bestätigt die Annahme, dass vor allem Tiere aus Zuchtställen, deren Züchter erwartungsgemäß mehr weibliche als männliche Tiere besitzen, untersucht wurden. Ein PKD positives Weibchen hat geringeren Einfluß auf die Gesamtzahl der positiven Tiere in einem Zuchtstall als ein positives Männchen, welches oft als einziger Stammvater in einem Zuchtstall eingesetzt wird.

6.3 Der Vererbungsmodus des Polyzystischen Syndroms

Die Untersuchungen wiesen auf einen dominanten Erbgang des Polyzystischen Syndroms hin.

Mit dem Chi-Quadrat Test konnte die Hypothese, es handelt sich bei dem Polyzystischen Syndrom um einen rezessiven Erbgang, abgelehnt werden. Hingegen konnte die Hypothese, es handelt sich bei dem Polyzystischen Syndrom um einen dominanten Erbgang, nicht abgelehnt werden

Zusätzlich konnte in dem zu Verfügung stehenden Datenmaterial eine Familie ausgemacht werden, bei der zwei PKD positive Elterntiere ein PKD negativen Nachkommen hervorbringen, was bei einem rezessiven Erbgang nicht möglich wäre. Allerdings handelt es sich bei dem gesamten Datenmaterial nur um eine Familie. Dabei ist zu berücksichtigen, dass es sich um eine Fehldiagnose bei der Ultraschalluntersuchung, deren Sicherheit mit 95% angegeben ist, handeln könnte. Weiterhin ist denkbar, dass bei der Erstellung des Abstammungsnachweis ein Fehler unterlaufen ist. Diese Familie kann deshalb allein nicht als eindeutiger Beweis für einen dominanten Erbgang dienen.

Jedoch ist es für einen rezessiven Vererbungsmodus typisch, dass aus der Paarung von zwei phänotypisch gesunden Tieren kranke Nachkommen hervorgehen, da ein Teil der gesunden Tiere heterozygot ist. Bei der Paarung von zwei heterozygoten Tieren wäre mit 50% Nachkommen (Anlageträgern) zu rechnen, die das Krankheitsgen tragen. Bei der Überprüfung des zur Verfügung stehenden Materials konnte kein Fall beobachtet werden, bei dem zwei PKD negative Tiere einen positiven Nachkommen geboren haben.

Der Vererbungsmodus wurde für das Polyzystische Syndrom der Katze bisher nur in einer Studie untersucht (Biller et al., 1996). In dieser Zuchtstudie wurde ein dominanter Erbgang ermittelt, der durch die vorliegenden Untersuchungen bestätigt wird.

Auch für die polyzystische Nierenerkrankung der Bull Terrier (BTPKD) wird ein dominanter Vererbungsmodus beschrieben (O' Leary et al., 2002).

Dagegen kennt man in der Humanmedizin für erbliche polyzystische Nierenerkrankungen eine rezessive und eine dominante Form (Zerres et. al., 1984).

Bei der Maus ist bisher keine natürlich vorkommende Mutation, die mit der autosomal dominanten PKD vergleichbar wäre, in der zugänglichen Literatur beschrieben

(Himmelbauer et. al., 1992). Hingegen ist bei der Maus eine Mutation, von der man annimmt, dass es sich um ein Homolog zur humanen rezessiven Form handelt, bekannt (Davisson et. al., 1991).

Dies deutet auf Spezies-spezifische Unterschiede im Vererbungsmodus von polyzystischen Nierenerkrankungen hin, die die Katze als Tiermodell für die autosomal dominante polyzystische Nierenerkrankung des Menschen interessant werden lässt.

6.4 Die Frage nach der Existenz von homozygoten Krankheitsträgern

Die Ergebnisse der durchgeführten Untersuchungen deuten darauf hin, dass Homozygotie für das Krankheitsallel des Polyzystischen Syndroms bei der Katze letal ist.

Die vorliegenden Daten wurden mittels Chi-Quadrat Test überprüft, sowohl auf das Modell "beim Polyzystischen Syndrom handelt es sich um einen dominanten Erbgang", als auch auf das Modell "beim Polyzystischen Syndrom handelt es sich um einen dominanten Erbgang und die Homozygotie des Krankheitsallels ist letal". Auf Grund dieser Ergebnisse konnte nicht entschieden werden, welches der beiden Modelle wahrscheinlicher ist.

Dies lag unter anderem daran, dass zu wenige Angaben über Wurfgrößen vorlagen. Es konnte jedoch anhand eines Teils der Abstammungsnachweise festgestellt werden, dass tendenziell die Verpaarung von PKD positiven Tieren eine geringere Wurfgröße zur Folge hatte. So konnten sieben Würfe, die aus der Verpaarung zweier PKD positiver Elterntiere hervorgingen, in den Daten ermittelt werden. Bei diesem Paarungstyp handelte es sich durchschnittlich um 1,86 Welpen pro Wurf (Spannweite eins bis drei). Zudem konnten acht weiteren Würfe, die aus der Verpaarung eines PKD positiven Elterntieres und eines PKD negativen Elterntieres hervorgingen ermittelt werden. Die Durchschnittliche Würfgröße bei diesem Paarungstyp lag bei 4,88 Welpen pro Wurf (Spannweite zwei bis sieben). Aus 75 zufällig ausgewählten Würfen konnte eine durchschnittliche Anzahl von 3,6 Welpen pro Wurf (Spannweite eins bis sieben) ermittelt werden.

Unterstützt wird dieses Ergebnis dadurch, dass in der Literatur bisher kein natürlich vorkommender homozygoter Krankheitsträger für PKD erwähnt wurde.

Auch geben verschiedene Tiermodelle, die für ADPKD entwickelt wurden Hinweise darauf, dass Homozygotie am Krankheitsgenort letal ist.

So wurde für PKD1 ein Mausmodell entwickelt, bei dem eine Deletion des Exon 34 vorliegt. Homozygote PKD1^{del34/del34}-Mäuse starben in utero mit massiven Veränderungen der Nieren, Pankreas und Lunge, während heterozygote PKD1^{+del34}-Tiere im Alter von 9-14 Monaten Nieren- und Leberzysten entwickelten. Bei einigen dieser Zysten konnte ein Fehlen von Polycystin 1 nachgewiesen werden (Lu et al., 1997; 1999). Bei einem weiteren Mausmodell, mit einer Insertionsmutation des Exon 4, kam es bei Homozygoten (PKD1^{ins4 / ins4}) zum embryonalen Tod, wobei hier zusätzlich massive Gewebswassersucht und Polyhydrammion festgestellt werden konnte (Lu et al., 1998).

Dies sind alles Hinweise darauf, dass Homozygotie des Krankheitsallels letal ist.

Jedoch müssen für ein gesichertes Ergebnis, insbesondere unter der Berücksichtigung, dass es Spezies-spezifische Unterschiede gibt, weitere Untersuchungen folgen.

Unter der Annahme, dass Homozygotie des Krankheitsallels letal ist, muß von einer Selektion auf das Krankheitsgen in der Perserkatzenzucht ausgegangen werden.

Unter dieser Voraussetzung kann die Frequenz des Krankheitsallels (p_0) selbst unter Annahme, dass 100% der Population PKD positiv ($K_0 = 1$) ist, nicht höher als 0,5 sein.

Die Frequenz dieses Genes würde dann in der F1-Generation auf $p_1 = 0,33$ sinken, wodurch sich auch der Anteil der PKD positiven Tiere in der F1-Generation (K_1) von $K_0 = 1$ auf $K_1 = 0,67$ verringert. Die Folge wäre, dass sich der Anteil PKD positiver Tiere von Generation zu Generation weiter reduzieren würde. Die einzige Erklärung für den hohen Anteil an PKD positiven Tieren in der Population ist, unter diesem Vererbungsmodus eine indirekte Selektion auf das Krankheitsgen.

6.5 Sequenzanalyse und intragenische Polymorphismen

In dieser Arbeit konnte ein Teil der Sequenz des felines PKD1 Genes dargestellt werden. Die Sequenz des felines PKD1 Genes wurde in der Literatur bis dato noch nicht beschrieben.

Zu beobachten ist eine hohe Übereinstimmung des felines Sequenzabschnittes mit der caninen (94,9 %) und der humanen (93,7 %) PKD1 Sequenz in den Exonabschnitten 42 und 43. Diese Übereinstimmungen sind wesentlich höher als die

Übereinstimmung mit der PKD1 Sequenz der Exons 42 und 43 der Maus (81,7 %). Diese Homologien lassen kein Zweifel daran, dass es sich bei der erzielten 376 bp langen Sequenz um einen Teil des PKD1 Genes der Katze handelt.

Für die Aufgabenstellung dieser Arbeit war es wichtig, möglichst viele intragenische Polymorphismen aufzuspüren. Die ausgewählten Primer überspannten ein Intron, da in diesen Bereichen das Auffinden von Polymorphismen als wahrscheinlicher gilt. Mutationen, die im Bereich von Introns auftreten, sind nicht im gleichen Maße der natürlichen Selektion unterworfen wie Mutationen, die in den Exonbereichen stattfinden, da es sich beim Exon um codierende DNS handelt. Die Sequenz von Introns ist im allgemeinen weniger konserviert. Für zukünftige Projekte, die das Aufspüren der krankheitsauslösenden Mutation zum Ziel haben, wäre das Screening der Exons erfolgversprechend, da Mutationen in diesen Bereichen mit Wahrscheinlichkeit von größerer Bedeutung sind.

Insgesamt konnten vier verschiedene Polymorphismen in dem erzielten Sequenzabschnitt ausgemacht werden. Zwei dieser Polymorphismen waren der Restriktionsanalyse zugänglich und wurden daher in der vorliegenden Arbeit näher untersucht.

Insgesamt wurde DNS von 154 Katzen auf den Restriktionsschnittstellenpolymorphismus RSP2 überprüft. Die in dieser Stichprobe ermittelte Allelfrequenz für das Allel A betrug 0,87 und für das Allel B 0,13.

Die Allelfrequenz für Allel B ist sehr niedrig und somit ist die resultierende Frequenz des homozygoten Genotyps (B/B) mit 0,013 entsprechend gering.

Auch der Wert für die Heterozygotie ist mit 0,226 sehr niedrig. Diese Tatsache erschwert die Assoziationsanalysen, so dass für den Nachweis der Assoziation bzw. Kopplung dieses Polymorphismus mit dem PKD1 Gen eine höhere Frequenz wünschenswert gewesen wäre.

Der Test auf das Hardy-Weinberg-Gleichgewicht (χ^2 -Wert von 0,142) ergab keinen Grund die Hypothese "Population befindet sich im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht" abzulehnen.

Der mit RSP4 bezeichnete Polymorphismus konnte mit Hilfe der Restriktionsanalyse nicht bestätigt werden. Es ist denkbar, dass es sich hierbei um einen Fehler der

Polymerase handelt. Um eine sichere Aussage machen zu können, müßten hierfür DNS Proben von verschiedenen Katzen sequenziert und verglichen werden.

6.6 Polymorphismus am Markerloкус FCA 476

In der Stichprobe konnten sechs verschiedene Allele und ein Heterozygotiewert von 0,55 am Markerloкус FCA 476 ermittelt werden.

Der berechnete Heterozygotiewert lag für unsere Stichprobe somit etwas niedriger als der in der Literatur angegebene Wert von 0,63 (Menotti-Raymond et al., 1999).

Für den Markerloкус FCA 476 sind entsprechend unseres Ergebnisses sechs verschiedene Allele in der Tabelle des Laboratory of Genomic Diversity (<http://rex.ncifcrf.gov/ccr/lgd/catgenome/animod.asp>) angegeben.

Mit der Darstellung des Markerloкус FCA 476 sollte in dieser Studie eine Kopplung mit dem Polyzystischen Syndrom nachgewiesen werden. Gewählt wurde dieser Markerloкус weil in der Literatur ein Hinweis auf Kopplung des felines PKD1 Gens mit dem Mikrosatelliten FCA 476 vorlag (DiBartola et al., 1999). Zudem konnte der Mikrosatellit FCA 476 dem Chromosom E3 der Katze zugeordnet werden (Menotti-Raymond et al., 1999).

Aus der Überprüfung der Stichprobe auf das Hardy-Weinberg Gleichgewicht ging ein χ^2 -Wert von 11,56 hervor. Bei fünf Freiheitsgraden und einem α von 0,05 liegt der Vergleichswert (p) bei 11,07. Der ermittelte χ^2 -Wert ist geringfügig größer als der angegebene Grenzwert. Aus diesem Grund konnte zunächst keine eindeutige Aussage getroffen werden. Bei genauerer Betrachtung der Stichprobenwerte fiel jedoch auf, dass der Genotyp 97/97 einmal vorkam. Der ermittelte Erwartungswert lag bei 0,17. Daraus ergibt sich eine Differenz von 0,83 und ein endgültiger Wert von 4. Dieser einzelne Wert beeinflusste die Summe des χ^2 -Wertes sehr stark. Wäre dieser Genotyp nicht aufgetreten, ergäbe sich bei fünf Freiheitsgraden ein χ^2 -Wert von 7,73. Dies würde dann eindeutig bedeuten, dass es keinen Grund gibt die Nullhypothese - Population befindet sich im Hardy-Weinberg Gleichgewicht abzulehnen.

6.7 Assoziationsstudie für die Marker RSP2 und FCA 476 mit dem Polyzystischen Syndrom

Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführte Assoziationsstudie ergab einen deutlichen Hinweis auf eine Assoziation der beiden Marker (RSP2 und FCA 476) mit dem Polyzystischen Syndrom. Grundlage dieser Studie war, dass sich Teilstichproben bei der Betrachtung eines unabhängig vererbten Merkmals nicht signifikant von der Gesamtstichprobe unterscheiden. Um familiäre Häufungen bestimmter Haplotypen zu vermeiden wurden nur Tiere, die nach den verfügbaren Stammbaumdaten nicht miteinander verwandt waren, ausgewählt.

Die ermittelten Allelfrequenzen unterschieden sich in den beiden Subpopulationen (PKD positiv und PKD negativ) deutlich von den Allelfrequenzen der Gesamtstichprobe.

Unter Annahme von Equilibrium wurde die Haplotypenverteilung überprüft. Weil es nicht möglich war, den doppelt heterozygoten Tiere eindeutige Haplotypen zuzuordnen, wurde der Test für alle möglichen Verteilungen durchgeführt. In der Gesamtstichprobe existierte eine Aufteilung der doppelt heterozygoten Tiere in Haplotypen in der Art, dass eine Anpassung an die Erwartungswerte unter Equilibrium möglich war. In den beiden Teilstichproben (PKD positiv und PKD negativ) war eine Anpassung an die Erwartungswerte unter Equilibrium und Unabhängigkeit vom Krankheitsgenort nicht mehr möglich.

Zudem wird die Annahme, dass es sich hierbei um eine Assoziation der Merkmale handelt, durch einen Bericht in der Literatur bestätigt (DiBartola et al., 1999). Anlässlich der *cat disease conference* 1998 erklärten DiBartola und Mitarbeiter, dass eine Kopplung des Mikrosatelliten FCA 476 und dem PKD1 Gen der Katze in einer Distanz von 10 cM mit einem LOD von 4 nachgewiesen wurde (DiBartola et al., 1999).

Zusammenfassend kann daraus geschlossen werden, dass alle drei Merkmale Polymorphismus am Markerloкус FCA 476, Krankheitsgenort für das Polyzystische Syndrom und Restriktionspolymorphismus RSP2 nicht unabhängig voneinander vererbt werden. Dies bedeutet insbesondere für zukünftige Studien, die ursächliche Mutation für das Polyzystische Syndrom ausfindig machen, dass sich die Untersuchungen auf das PKD1 Gen der Katze konzentrieren sollten.

6.8 Kopplungsanalyse mittels LOD Score

Durch eine Kopplungsanalyse konnte in dieser Arbeit eindeutig eine Kopplung (LOD 6,91) des Mikrosatelliten FCA 476 mit dem Polyzystischen Syndrom nachgewiesen werden. Somit kann die ursächliche Mutation für das Polyzystische Syndrom dem Chromosom E3, in die Nähe des Markers FCA 476 und daher mit großer Wahrscheinlichkeit dem PKD1 Gen der Katze zugeordnet werden.

Für den Mikrosatellitenmarker konnten vier Familien ermittelt werden, deren Daten in die LOD Score Berechnung eingingen. Insgesamt wurden 23 informative Meiosen beobachtet, wobei es sich in keinem Fall um einen Rekombinanten handelte. Die Kopplungsanalyse für den Mikrosatellitenmarker FCA 476 mit dem Polyzystischen Syndrom ergab einen LOD Score von 6,91. Da bereits bei einem LOD Score von 3 die Wahrscheinlichkeit einer Kopplung 1000 mal größer ist als die Wahrscheinlichkeit keiner Kopplung, gilt die Kopplung als nachgewiesen.

Einige Nachkommen der Stammbäume konnten nicht mit in die Berechnung einfließen, da sie keinen Informationsgehalt hinsichtlich der Kopplungsphase besaßen. Mindestens ein Elternteil muß doppelt heterozygot für zwei Loci sein, um eine Information über die Genkopplung zu liefern. So mußte der Stammbaum Nummer eins (s. Abb. 43) von elf auf zehn Nachkommen für diese Analyse reduziert werden. Der Nachkomme 2082 besitzt die Allele A, a, 102, 100, sein Vater 2050 die Allele A, a, 102, 100 und seine Mutter die Allele A, a, 100, 100. Der Nachkomme gibt somit keinen eindeutigen Hinweis auf die Kopplungsphase des Vaters, da er sowohl den Haplotyp A/102 als auch den Haplotyp a/102 vom Vater geerbt haben kann. Würde es sich um einen Rekombinanten handeln, so wäre er in diesem Fall nicht zu erkennen. Entsprechend wurde der Stammbaum Nummer zwei von sechs auf drei und der Stammbaum Nummer drei von elf auf acht Nachkommen reduziert.

Da aufgrund des ermittelten LOD Wertes eine Kopplung des Krankheitsgenortes für das Polyzystische Syndrom und dem Markerallel 100 als gesichert gilt, wurden auch die verbleibenden Individuen daraufhin überprüft.

Bei dieser Überprüfung fiel ein Tier mit der Nummer 2040 auf, welches laut unserer Daten PKD positiv getestet wurde, obwohl es die Markerallele 99/99 trug. Eine mögliche Erklärung könnte sein, dass es sich bei diesem Tier um einen Rekombinanten handelt. Möglich wäre auch eine Fehldiagnose bei der Ultraschalluntersuchung (95% Sicherheit) hinsichtlich der PKD Erkrankung. Eine

falsch negative Diagnose ist wahrscheinlicher als eine falsch positive Diagnose, weil sehr kleine Zysten in den Nieren leichter zu übersehen sind. In dem zweiten aufgefundenen Fall wäre eine falsch negative Fehldiagnose denkbar. Hierbei gehen aus der Paarung eines PKD positiven Vattertieres mit den Markerallelen 101/100 und einem PKD negativen weiblichen Tier mit den Markerallelen 100/97 ein weiblicher PKD negativer Nachkomme mit den Markerallelen 100/100 hervor. Bei einer Kopplung von PKD positiv mit dem Allel 100 müsste dieser Nachkomme PKD positiv sein.

Für den intragenischen Marker (Restriktionspolymorphismus RSP2) war es nicht möglich, informative Familien ausfindig zu machen. Zum einen war die Allelfrequenz sehr gering ($f_B = 0,13$) und zum anderen lieferten die Familien, in denen der Polymorphismus segregierte, keine Information hinsichtlich der Kopplungsphase. Aus diesem Grund konnte keine Kopplungsanalyse mittels LOD Wert durchgeführt werden. Um eine Kopplungsanalyse für den Restriktionspolymorphismus RSP2 durchführen zu können, müssten gezielt Familien untersucht werden, in denen dieser Marker segregiert.

6.9 Schlußfolgerung und Ausblick

Mit den vorliegenden Ergebnissen konnte gezeigt werden, dass der Krankheitsgenort für das Polyzystische Syndrom der Katze mit großer Sicherheit auf dem E3 Chromosom in der Nähe des Markerlokus FCA 476 und daher auf dem PKD1 Gen zu suchen ist.

Für die Entwicklung eines genetischen Test zur Diagnose des Polyzystischen Syndroms wäre das Auffinden der krankheitsauslösenden Mutation von großer Bedeutung, weil damit der genetische Nachweis dieser Erkrankung einfach durchgeführt werden kann. Schwierigkeiten bei der Suche nach der ursächlichen Mutation bereitet die Größe des Gens sowie sein Reichtum an den Basen Guanin und Cytosin. In dieser Arbeit konnte eine katzenspezifische Sequenz mit einer Länge von 376 Basenpaaren, sowie einen intragenischen Polymorphismus dargestellt werden. Die Aussagekraft dieses Restriktionspolymorphismus ist für einen genetischen Test bezogen auf eine Population, wegen seiner niedrigen Frequenz, gering. Wenn die ursächliche Mutation nicht bekannt ist, kann die Erkrankung genetisch nachgewiesen werden, indem genügend gekoppelte Markergenorte bekannt sind. Je höher hierbei die Anzahl der gekoppelten Marker ist, desto sicherer und zuverlässiger wird dann die Aussagekraft hinsichtlich einer PKD Erkrankung.

In dieser Studie bedeutet der Genotyp B/B des Restriktionspolymorphismus, dass das entsprechende Tier PKD negativ ist. Zudem sollte ein Tier, welches nicht das Allel 100 des Markerlokus FCA 476 besitzt PKD negativ sein. Zu beachten ist hierbei, dass bei dem Markerlokus FCA 476 aufgrund seiner Distanz zum PKD1 Gen eher mit Rekombinanten zu rechnen ist und dies zu falsch positiven bzw. zu falsch negativen Beurteilungen führen kann. Daher wäre für zukünftige Studien die Überprüfung weiterer Polymorphismen sicherlich hilfreich. In der folgenden Zeichnung wird dies verdeutlicht. Das Allel A des gefundenen Markergenorts RSP2 kommt sowohl in Kombination mit dem krankheitstragenden Allel (K) wie auch mit dem Wildtyp Allel (G) vor. Das Allel B des gefundenen Markergenort RSP2 kommt jedoch nur in Kombination mit dem Wildtyp Allel (G) vor. So würde es sich bei einem den Genotyp B/B tragenden Tier, von Rekombinationsereignissen abgesehen, immer um ein gesundes Tier handeln.

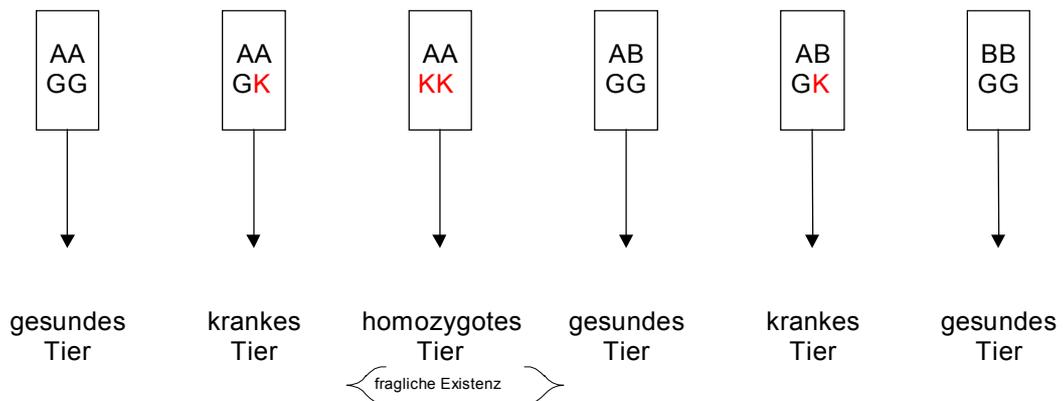
Abb. 52: Aufbau eines genetischen Test mit Hilfe eines gekoppelten Markers



Mögliche Kombinationen der Genlokalisationen :

A **A** **B**
G **K** **G**

Daraus abgeleitete mögliche Genotypen :



Schlußfolgerung :

- Tiere mit dem Genotyp BB sind mit Sicherheit gesund.

Mit dieser Zeichnung soll ein möglicher genetischer Test verdeutlicht werden. Das Allel A des gefundenen Markergenort kommt sowohl in Kombination mit dem Allel (K), welches die krankheitsauslösende Mutation trägt, wie auch mit dem Wildtyp Allel (G) vor. Das Allel B des gefundenen Markergenort kommt jedoch nur in Kombination mit dem Wildtyp Allel (G) vor. So würde es sich bei einem den Genotyp B/B tragenden Tier immer um ein gesundes Tier handeln.

Nicht nur hinsichtlich der Entwicklung eines genetischen Test sind zukünftige Studien zur Analyse der genomischen Sequenz des felines PKD1 Gen von Bedeutung. Auch als Tiermodell kann die Katze wertvolle Beiträge zum Verständnis der molekularen Mechanismen leisten (Menotti-Raymond et al., 1999). Einige hundert Erkrankungen, welche mendelnde Vererbungsmuster zeigen, sind bisher bei der Katze identifiziert und charakterisiert worden (Nicholas et al., 1998; Migaki, 1982; Robinson, 1977). Viele davon sind analog zu humanen Erbkrankheiten, wie die autosomal dominante polyzystische Nierenerkrankung (Biller et al., 1996), die Retinaatrophie (Narfström, 1983), die Primäre Hyperoxalurie Typ2 (Danpure et al., 1983), die Glykogen Speicherkrankheit Typ IV (Fyfe et al., 1989) und der Hypothyreodismus (Tanase et al., 1991).

Das Polyzystische Syndrom der Katze ist der humanen autosomal dominanten Nierenerkrankung sehr ähnlich und so kann die Katze zukünftig als Tiermodell auch für die Humanmedizin von großem Wert sein.

6.10 Neuste Erkenntnisse und kürzlich veröffentlichte Ergebnisse zu PKD

Im Oktober 2004 wurde die Sequenz des felines PKD1 Gens und die verantwortliche Mutation von einer Arbeitsgruppe in den USA veröffentlicht (Lyons et al., 2004) Die Untersuchung an 48 PKD positiven und 33 PKD negativen Katzen enthüllte eine Mutation im Exon 29 als Auslöser für das Polyzystische Syndrom. Bei der Mutation handelt es sich um eine C > A Transversion, welche ein Stopcodon und den Verlust von 25% des C-Terminus des Proteins zur Folge hat. Zudem erzeugt die Mutation eine Restriktionsstelle für das Enzym MLY1, welches ein 559 bp langes Amplifikat in zwei 316 bp und 243 bp lange Fragmente schneidet. Die Mutation tragende Tiere können nun mittels RFLP Analyse identifiziert werden. Die veröffentlichten Ergebnisse bestätigen somit die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, welche die ursächliche Mutation für PKD dem PKD1 Gen zuordnet.

Zudem wird der in der vorliegenden Arbeit erzielte Hinweis darauf, dass Homozygotie für das Krankheitsallel des Polyzystischen Syndroms bei der Katze letal ist, dadurch untermauert, dass bei den in den USA untersuchten PKD positiven Tieren kein für die verursachende Mutation homozygoten Tier identifiziert werden konnte.

Der in der vorliegenden Arbeit ermittelte Abschnitt des felinen PKD1 Gens ergab eine Übereinstimmung der Exonabschnitte mit dem caninen PKD1 Gen von 94,9%, mit dem humanen PKD1 Gen von 93,7% und mit dem PKD1 Gen der Maus von 81,7%.

Die Übereinstimmung aller Exonabschnitte des felinen PKD1 Gens wird von der amerikanischen Arbeitsgruppe mit 83,66% für das canine, mit 80,02% für das humane und mit 73,44% für das Maus PKD1 Gen angegeben (Lyons et al., 2004). Demnach kommen beide Arbeiten zu dem Ergebniss, dass die größte Übereinstimmung mit der Sequenz des Hundes und die geringste Übereinstimmung mit der Sequenz der Maus besteht.

Die im humanen ADPKD1 Gen vorhandenen homologen Gene sowie die zwei Polypyrimidin Sequenzen in Intron 21 und 22 kommen bei der Katze nicht vor (Lyons et al., 2004).

Die Untersuchungen für die vorliegende Arbeit haben sich zeitlich mit den Untersuchungen der amerikanischen Arbeitsgruppe überschritten. Beide Arbeiten kommen hinsichtlich der Lokalisation der PKD verursachenden Mutation zu dem gleichen Ergebnis, welches von der amerikanischen Arbeitsgruppe kurz vor dem Einreichdatum der vorliegenden Arbeit veröffentlicht wurde. Dennoch sind die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit wichtig, weil nicht davon ausgegangen werden kann, dass es sich in allen Katzenpopulationen um die gleiche verursachende Mutation handelt. Die veröffentlichte Arbeit von Lyons und Mitarbeitern repräsentiert ausschließlich Katzen der Vereinigten Staaten. Mutationen können über das gesamte PKD1 Gen der Katze verstreut gefunden werden (Lyons et al., 2004). Von der humanen ADPKD ist bekannt, dass neben dem ADPKD1 Gen auch das ADPKD2 Gen für die Erkrankung verantwortlich sein kann. Jede auf ADPKD untersuchte Familie weist, von einigen wenigen Ausnahmen abgesehen, eine eigene Mutation auf (Rossetti et al., 1996; Neophytou et al., 1996; Turco et al., 1996; Roelfsema et al., 1996; Pearl et al., 1996; Turco et al., 1995; Pearl et al., 1995). Demnach wäre es auch für die Katze denkbar, dass Mutationen im PKD2 Gen ursächlich für die Erkrankung verantwortlich sein könnten. Ähnlich der familiären Unterschiede bei der humanen ADPKD könnten sich die amerikanischen und europäischen Katzenpopulationen unterscheiden. Mit der von Lyons und Mitarbeitern entwickelten RFLP Analyse können in Zukunft die verschiedenen Katzenpopulationen wesentlich schneller und leichter auf die identifizierte Mutation hin überprüft werden. Damit kann die Frage, ob es in der Katzenpopulation nur um eine oder noch weitere Mutationen handelt, die eventuell

auch das PKD2 Gen betreffen, sicherlich bald beantwortet werden. Die vorliegende Arbeit weist für die untersuchte deutsche Population auf eine Mutation im PKD1 Gen hin.

7. Zusammenfassung

Das Polyzystische Syndrom (PKD) ist eine in der Perserzucht weit verbreitete erbliche Erkrankung. Die klinischen Erscheinungen bei Katzen sind denen der autosomal dominanten polyzystischen Nierenerkrankung des Menschen sehr ähnlich. Die Diagnose der felines PKD wird derzeit mittels Ultraschall gestellt. Bis dato gab es keinen genetischen Test, und molekularbiologische Untersuchungen waren rar.

Bei der humanen PKD sind insgesamt drei Gene bekannt, die für die Erkrankung verantwortlich sein können. Die Frage, ob es sich bei dem für das Polyzystische Syndrom verantwortliche Gen um das feline PKD1 Gen handelt, ist bis dato jedoch unbeantwortet.

Ziel dieser Arbeit war es, das für die Erkrankung verantwortliche Gen der Katze zu bestimmen. Ein weiteres Ziel war es, die vorhandene Stichprobe zu charakterisieren und in Hinblick auf die mögliche Entwicklung eines genetischen Tests für PKD molekularbiologisch zu untersuchen. Nicht nur hinsichtlich der Entwicklung eines genetischen Tests, sind Studien zur Analyse der genomischen Sequenz des felines PKD1 Gen von Bedeutung. Auch als Tiermodell kann die Katze wertvolle Beiträge zum Verständnis der molekularen Mechanismen leisten.

Die untersuchte Stichprobe (n = 315) wies insgesamt 43% für das Polyzystische Syndrom positive Tiere auf. Wobei 48,7% der männlichen Tiere (n = 115) und 37,5% der weiblichen Tiere (n = 200) positiv für das Polyzystische Syndrom waren. Bei der Untersuchung hinsichtlich des Erbganges für das Polyzystische Syndrom mittels Chi-Quadrat Test konnte ein rezessiver Erbgang ausgeschlossen werden. Bei der Überprüfung des dominanten Erbganges sowie des dominanten Erbganges mit zusätzlicher Letalität bei Homozygotie des Krankheitsgenortes konnte nicht entschieden werden, welche der beiden Formen wahrscheinlicher ist. Die Ergebnisse der durchgeführten Untersuchungen deuteten jedoch darauf hin, dass Homozygotie für das Krankheitsallel des Polyzystischen Syndroms bei der Katze letal ist. Erstmals konnte in dieser Arbeit ein Sequenzabschnitt des felines PKD1 Genes ermittelt werden. Dieser Abschnitt ergab eine Übereinstimmung der Exonabschnitte von 94,9% mit dem caninen PKD1 Gen, von 93,7% mit dem humanen PKD1 Gen und von 81,7% mit dem PKD1 Gen der Maus. Bei dem Vergleich dieses Sequenzabschnittes von einer PKD positiven und einer PKD negativen Katze konnten schließlich vier verschiedene Polymorphismen ausgemacht werden. Einer der Polymorphismen

(RSP2) konnte mittels Restriktionsanalyse in der Stichprobe nachgewiesen werden und erzielte einen Heterozygotiewert von 0,226.

Die Untersuchung des Polymorphismus am Markerlokus FCA 476 ergab in der Stichprobe sechs verschiedene Allele und einen Heterozygotiewert von 0,55. Die durchgeführte Assoziationsstudie ergab deutliche Hinweise auf eine Assoziation der beiden Marker (RSP2 und FCA 476) mit dem Polyzystischen Syndrom. Bei der durchgeführten Kopplungsanalyse für den Polymorphismus am Markerlokus FCA 476 und dem Polyzystischen Syndrom konnte ein LOD-Wert von 6,91 erzielt werden.

Zusammenfassend konnte somit gezeigt werden, dass der Krankheitsgenort für das Polyzystische Syndrom der Katze mit großer Sicherheit auf dem Chromosom E3 in der Nähe des Markerlokus FCA 476 auf dem PKD1 Gen zu suchen ist.

8. Summary

The feline polycystic kidney disease (PKD) is an inherited disease found in Persian cats first. The clinical features of PKD are similar to human autosomal dominant polycystic kidney disease. So far PKD is diagnosed by echocardiography. Up to date there is no genetic test and there are only few molecular biological studies available. Three different genes are known for their ability to cause autosomal dominant polycystic kidney disease in human. Up to date the question whether the feline PKD1 gene or the feline PKD2 gene is responsible for the disease is not known. The aim of the present study was to identify the responsible gene for the feline polycystic kidney disease, to characterise a chosen cat population and to accomplish molecular biological investigations, which can be the bases to develop a genetic test for PKD.

The analysed population ($n = 315$) revealed a total of 43% PKD positive individuals, in which 48,7% of the males ($n = 115$) and 37,5% of the females ($n = 200$) were positive for PKD. Investigations concerning the inheritance of PKD by Chi-Square test could exclude a recessive pattern. With the present data it was not possible to decide if the dominant pattern or the dominant pattern with additionally lethality of the homozygous disease gene is more likely. In this study a segment of the feline PKD1 gene sequence was identified. This sequence showed a similarity in its exons of 94.9% with the canine PKD1 gene, of 93.7% with the human PKD1 gene and of 81.7% with the mouse PKD1 gene. By comparing the sequence of PKD positive and a PKD negative cat, four different polymorphisms could be identified. One of the polymorphism (RSP2) could be verified in the samples by restriction analysis and achieved a heterozygosity of 0.226. The analysis of the polymorphism FCA 476 arosed six different alleles and a heterozygosity of 0.55 in the examined population. The accomplished association study showed that the polymorphism (RSP2), the polymorphism FCA 476 and PKD are not inherited independently from each other. The enforced linkage analysis between the polymorphism FCA 476 and PKD revealed a LOD score of 6.91.

This study could show that the disease loci for PKD in cats certainly lies on chromosome E3 within a short distance of the marker FCA 476 and it is most likely that it is located at the feline PKD1 gene.

9. Literaturverzeichnis

- American PKD1 Consortium (1995) Analysis of the genomic sequenz for the autosomal dominant polycystic kidney disease (PKD1) gene predicts the presence of a leucine-rich repeat. *Hum Mol Genet* 4, 575-582
- Arnould T, Kim E, Tsiokas L, Jochimsen F, Gruning W, Chang JD, Walz G (1998) The polyzystic kidney disease 1 gene product mediates protein kinase C alpha-dependent and c-Jun N-terminal kinase-dependent activation of the transcription factor AP-1. *J Biol Chem* 273 (11), 6013-6018
- Barrett KE, Keely SJ (2000) Chloride secretion by the intestinal epithelium: molecular basis and regulatory aspects. *Annu Rev Phyiol* 62, 535-572
- Barthez PY, Rivier P, Begon D (2003) Prevalence of polycystic kidney disease in Persian and Persia related cats in France. *J Feline Med Surg* 5 (6), 345-347
- Battershell D, Garcia JP (1969) Polycytic kidney disease in a cat. *J Am Vet Med Assoc* 154, 665-666
- Berg P, Singer M (1993) *Die Sprache der Gene*. Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg; Berlin; Oxford
- Biller DS (2000) *Das Polycystische Syndrom*, Informationsbroschüre von Royal Canine.
- Biller DS, Chew DJ, DiBartola SP (1990) Polycystic kidney disease in a family of Persian cats. *JAVMA* 196 (8), 1288-1290
- Biller DS, DiBartola SP, Eaton KA, Pflueger S, Wellman ML, Radin MJ (1996) Inheritance of Polycystic Kidney Disease in Persian Cats. *J Hered* 87, 1-5
- Boese SH, Glanville M, Aziz O, Gray MA, Simmons NL (2000) Ca²⁺ and cAMP-activated Cl⁻ conductances mediate Cl⁻ secretion in a mouse renal inner medullary collecting duct cell line. *J Physiol* 523, 325-338
- Brasier JL, Henske EP (1997) Loss of the polycystic kidney disease (PKD1) region of chromosom 16p13 in renal cyst cells supports a loss of function model for cyst pathogenesis. *J Clin Invest* 99, 194-199
- Broackes-Carter FC, Mouchel N, Gill D, Hyde S, Bassett J, Harris A (2002) Temporal regulation of CFTR expression during ovine lung development: implications of CF gene therapy. *Hum Mol Genet* 11, 125-131

- Brown TA (1993) *Moderne Genetik*. Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg; Berlin; Oxford
- Burn TC, Connors TD, Dackowshi WRI (1995) Analysis of the genomic sequence for the autosomal dominant polycystic kidney disease (PKD1) gene predicts the presence of a leucine rich repeat. *Hum Mol Genet* 4, 575-582
- Calvet JP, Parnell SC, Magenheimer BS, Maser RL (2000) The polycystic kidney disease-1 protein, polycystin 1, binds and activates heterotrimeric G-proteins in vitro and in vivo (abstract). 5th International Workshop on PKD, Leiden/Noordwijkerhout, The Netherlands, 11–12 May, 2000
- Calvet JP (1998) Molecular genetics of polycystic kidney disease. *J N* 11 (1), 24-34
- CFA The Cat Fanciers Association Health Committee (1998) CFA Health Committee Polycystic kidney Disease Seminar, [Internet] <http://www.cfainc.org/health/pkd.html>
- CFA The Cat. Fanciers Association Health Committee, Biller DS, DiBartola SP Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease in Persian Cats. [Internet] <http://www.cfainc.org/health/pkd.html>
- Cannon MJ, MacKay AD, Barr FJ, Rudolf H, Bradley KJ, Gruffydo, Jones TJ (2001) Prevalence of polycystic kidney disease in Persian cats in the United Kingdom. *Vet Rec* 149 (14), 409-411
- Chapman AB, Johnson A, Gabow PA, Schrier RW (1990) The renin–angiotensin–aldosterone system and autosomal dominant polycystic kidney disease. *New Eng J Med* 323, 1091-1096
- Chauveau D, Pirson Y, Verellen-Dumoulin C, Macnicol A, Gonzalo A, Grünfeld JP (1994) Intracranial aneurysms in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Kidney Int* 45, 1140-1146
- Cole BR, Conley SB, Stapleton FB (1987) Polycystic kidney disease in the first year of live. *J Pediatr* 111, 693-699
- Cook JA, Oliver K, Mueller RF, Sampson J (1996) A cross sectional study of renal involvement in tuberous sclerosis. *J Med Genet* 33, 480-484
- Crowell WA, Hubbel JJ, Riley JC (1979) Polycystic Renal Disease in related Cats. *JAVMA* 175 (3), 286-288
- Cuffe JE, Biefeld-Ackerman A, Thomas J, Leipziger J, Korbmacher C (2000) ATP stimulates Cl^- secretion and reduces amiloride-sensitive Na^+ absorption in M-1 mouse cortical collecting duct cells. *J Physiol* 524, 77-90

- Dackowski WR, Luderer HF, Manavalan P, Bukanov NO, Russo RJ, Roberts BL, Klinger KW, Ibraghimov-Beskrovnaya O (2002) Canine PKD1 is a single-copy gene: Genomic Organization and Comparative Analysis. *Genomics* 80 (1), 105-112
- Danpure CJ, Jennings PR, Mistry J, Chalmers RA, McKerrell RE, Blakemore WF, Heath MF (1989) Enzymological characterisation of a feline analogue of primary hyperoxaluria type2: A model for the human disease. *J Inherited Metab Disorders* 12, 403-414
- Daoust MC, Reynolds DM, Bichet DM, Somlo S (1995) Evidence for a third genetic locus for autosomal dominant polycystic kidney disease. *Genomics* 25, 733-736
- Davidow CJ, Maser RL, Rome LA, Calvet JP, Grantham JJ (1996) The cystic fibrosis transmembrane conductance Regulator mediates transepithelial fluid secretion by human autosomal dominant polycystic kidney disease epithelium in vitro. *Kidney Int* 50, 208-218
- Davisson MT, Guay-Woodford LM, Harris HW, D'Eustachio P (1991) The mouse polycystic kidney mutation (cpk) is located on proximal chromosom 12. *Genomics* 9, 778-781
- Delmas P, Nomura H, Li X, Lakkis M, Luo Y, Segal Y (2002) Constitutive activation of G-protein by polycystin-1 is antagonized by polycystin-2. *J Biol Chem* 277, 11276-11283
- DiBartola SP, Eaton KA, Raymond MM, Biller DS, Wellman ML, Radin MJ (1999) Autosomal dominant polycystic kidney disease in Persian cats. *Feline Practice Supplement* 99
- Drmanac R, Drmanac S, Szreoska Z (1993) DNA sequence determination by hybridization: a strategy for efficient large scale sequencing. *Science* 260, 1649-1652
- Eaton KA, Biller DS, DiBartola SP, Radin MJ, Wellman ML (1997) Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease in Persian and Persian-cross Cats. *Vet Path* 34, 117-126
- Francken BJ, Jurzak M, Vanhauwe JF, Luyten WH, Leysen JE (1998) The human 5-HT_{5A} receptor couples to Gi/Go proteins and inhibits adenylate cyclase in HEK 293 cells. *Eur J Pharmacol* 361, 299-309
- Fyfe JC, Giger U, Van Winkle TJ, Haskins ME, Steinberg SA, Wang P, Patterson DF (1992) Glycogen storage disease type IV: Inherited deficiency of branching enzyme activity in cats. *Pediatr Res* 32, 719-725

- Gabow PA (1990) Autosomal dominant polycystic kidney disease – more than a renal disease. *Am J Kidney Dis* 16, 403-413
- Gabow PA (1993) Autosomal dominant polycystic kidney disease. *The New England Journal of Medicine* 329, 322-342
- Gabow PA, Grantham JJ (1997) Polycystic kidney disease. In: Schrier RW, Gottschalk CW, eds. *Disease of the kidney*. Boston: Little Brown and Company 521-560
- Gabow PA, Johnson AM, Kaehny WD, Kimberling WJ (1992) Factors affecting the progression of renal disease in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Kidney Int* 41, 1311-1319
- Ganghi R, Elble RC, Gruber AD, Schreur KD, Ji HL, Fuller CM (1998) Molecular and functional characterization of a calcium-sensitive chloride channel from mouse lung. *J Biol Chem* 273, 32096-32101
- Gardner Kd jr., Glew RH, Evan AP, McAteer JA, Bernstein J (1994) Why renal cysts grow. *Am J Physiol* 266, F353-359
- Germino GG, Weinstat-Saslow D, Himmelbauer H (1992) The gene for autosomal dominant polycystic kidney disease lies in a 750kb CpG-rich region. *Genomics* 13, 144-151
- Grantham JJ (1993) Fluid secretion, cellular proliferation, and the pathogenesis of renal epithelial cysts. *Am J Soc Nephrol* 4, 1843-1857
- Grantham JJ (1993) Polycystic Kidney Disease: Hereditary and Acquired. *Adv Intern Med* 38, 409-420
- Grantham JJ (1995) Polycystic kidney disease: Etiology, pathogenesis, and treatment. *Disease-A-Month* 41, 693-765
- Greger R (1996) The membrane transporters regulating epithelial NaCl secretion. *Pflugers Arch* 432, 579-588
- Gretz N, Zeier M, Geberth S, Strauch M, Ritz E (1989) Is gender a determinant for evolution of renal failure? A study in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Am J Kidney Dis* 14, 178-183
- Grünfeld JP, Chauveau D, Knebelmann (1992) Autosomal dominant polycystic kidney disease: from molecular genetics to the patients. *Clin Invest* 70, 791-793
- Hansson L, Karlander LE, Lundgren W, Peterson LE (1974) Hypertension in polycystic kidney disease. *Scand J Urol Nephrol* 8, 203-205

- Harris PC, Ward CJ, Peral B, Hughes J (1995) Autosomal dominant polycystic kidney disease: Molecular analysis. *Hum Mol Genet* 4, 1745-1749
- Harris PC, Ward CJ, Peral B, Hughes J (1995) Polycystic kidney disease 1: Identification and analysis of the primary defect. *J Am Soc Nephrol* 6, 1125-1133
- Herzog A (1995) Klinische Zytogenetik der Haustiere. JF Lehmanns Fachbuchhandlung
- Himmelbauer H, Pohlschmidt M, Snarey A, Germino GG, Weinstat-Saslow D, Somlo S, Reeders ST, Frischauf AM (1992) Human-Mouse Homologies in the Region of the Polycystic Kidney Disease Gene (PKD1). *Genomics* 13, 35-38
- Huber SM, Braun GS, Segerer S, Veh RW, Horster MF (2000) Metanephrogenic mesenchyme-to-epithelium transition induces profound expression changes of ion Channels. *Am J Renal Physiol* 279, F65-76
- Hughes J, Ward CJ, Pearl B, Aspinwall R, Clark K, San Millan JL, Gamble V, Harris PC (1995) The polycystic kidney disease 1 (PKD1) gene encodes a novel protein with multiple cell recognition domains. *Nature Gen* 10, 151-160
- Jorde B, Carey JC, Bamshad MJ (2000) Medical Genetics. Mosby Verlag
- Kim E, Arnould T, Sellin L, Benzing T, Comella N, Kocher O (1999) Interaction between RGS7 and polycystin. *Proc Natl Acad Sci USA* 96, 6371-6376
- Kimberling WJ, Kumar S, Gabow PA, Kenyon JB, Conolly CJ, Somlo S (1993) Autosomal dominant polycystic kidney disease: localisation of the second gene on chromosom 4q 13-23. *Genomics* 18, 467-472
- Koptides M, Constantinides R, Kyriakides G, Hadjigavriel M, Patsalis PC, Pierides A, Deltas CC (1998) Loss of heterozygosity in polycystic kidney disease with missense mutation in the repeated region of PKD1. *Hum Genet* 103, 709-717
- Koptides M, Deltas CD (2000) Autosomal dominant polycystic kidney disease: molecular genetics and molecular Pathogenesis. *Hum Gen Aug* 107 (2), 115-126
- Koptides M, Hadjimichael C, Koupepidou P, Pierides A, Constantinou Deltas C (1999) Germinal and somatic mutations in PKD2 gene of renal cysts in autosomal dominant kidney disease. *Hum Mol Genet* 8, 509-513
- Koulen P, Cai Y, Geng L, Meada Y, Nishimura S, Witzgall R (2002) Polycystin-2 is an intracellular calcium release channel. *Nat Cell Biol* 4, 191-197
- Laboratory of Genetic Diversity (LGD) [Internet]
<http://rex.ncifcrf.gov/ccr/lgd/catgenome/animod.asp>

- Lieske JC, Toback FG (1993) Autosomal dominant polycystic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 3, 1142-1450
- Liu PC, Chen YW, Shibuya H, Lubahn DB, Johnson GS (1998) A length polymorphism in an intron of the canine polycystic kidney disease 1 gene. *Animal Genet* 29, 322-323
- Löhning C, Nowicka U, Frischauf AM (1997) The mouse homolog of PKD1: sequence analysis and alternative splicing. *Mammalian Genome* 8, 307-311
- Lu W, Babakhanlou H, Genest D, Zhou J (1998) 'Loss of function' as a mechanism for cytogenesis in mice with PKD1 'null' mutation. *J Am Soc Nephrol* 9, 378a
- Lu W, Fan X, Basora N, Babakhanlou H, Law T, Rifai N, Harris PC, Peter-Atayde AR, Rennke HG, Zhou J (1999) Perinatal lethality with kidney and pancreas defects in mice with targeted PKD1 mutation. *Nature Genet* 21, 160-161
- Lu W, Peissel B, Babakhanlou H, Pavlova A, Geng L, Fan X (1997) Perinatal lethality with kidney and pancreas defects in mice with a targeted PKD1 mutation. *Nature Genet* 17, 179-181
- Lyons LA, Biller DS, Erdman CA, Lipinski MJ, Young AE, Roe B, Qin B, Grahn RA (2004) Feline Polycystic Kidney Disease Mutation Identified in PKD1. *J Am Soc Nephrol* 15, 2548-2555
- Martin R (1996) Elektrophorese von Nucleinsäuren. Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg; Berlin; Oxford
- Matthews JB, Hassan I, Meng S, Archer SY, Hrnjez BJ, Hodin RA (1998) Na-K-2Cl cotransporter gene expression and function during enterocyte differentiation. Modulation of Cl⁻ secretory capacity by butyrate. *J Clin Invest* 101, 2072-2079
- McCarthy S, McMullen M (1997) Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease: Pathophysiology and Treatment, *ANNA Journal* 24 (1), 45-53
- Menotti-Raymond M, David VA, Lyons LA, Schäffer AA, Tomlin JF, Hutton MK, O'Brian J (1999) A Genetic Linkage Map of Microsatellites in the Domestic Cat (*Felis catus*). *Genomics* 57, 9-23
- Meyer-Lindenberg A, Janthur M, Sommer B, Nolte I (1999) Untersuchungen zur polyzystischen Nierendegeneration (PKD) bei Perserkatzen. *Katzen: Magazin für Katzenfreunde* Jan/Feb (1), 28-30
- Meyers RM, Maniatis T, Lerman LS (1987) Detection and localisation of single base changes by denaturing gradient gel electrophoresis. *Methods Enzymol* 155, 501-527

- Migaki G (1982) Compendium of inherited metabolic diseases in animals. *Prog Clin Biol Res* 94, 473-501
- Mirkin SM, Frank-Kamenetskii MD (1994) H-DNA and related structures. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 23, 541-576
- Mochizuki T, Wu G, Hayashi T (1996) PKD 2, a gene for polycystic kidney disease that encodes an integral membrane protein. *Science* 272, 1339-1342
- Moy GW, Mendoza LM, Schulz JR, Swanson WJ, Glabe CG, Vacquier VD (1996) The sea urchin sperm receptor for egg jelly is a modular protein with extensive homology to the human polycystic kidney disease protein, PKD1. *J Cell Biol* 133, 809-817
- Mullis, KB (1990) The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Sci Am* 262 (4), 56-61
- Murcia NS, Woychik RP, Avner ED (1998) The molecular biology of polycystic kidney disease. *Pediatr* 12, 721-726
- Narfström K (1983) Hereditary progressive retinal atrophy in the Abyssinian cat. *J Hered* 74, 273-276
- Neophytou P, Constantinides R, Lazarou A, Pierides A, Deltas CC (1996) Detection of a novel nonsense mutation and an intragenic polymorphism in the PKD1 gene of a Cypriot family with autosomal dominant polycystic kidney disease. *Hum Genet* 98, 437-442
- Newton CR, Graham A (1994) PCR. Spektrum, Akademischer Verlag GmbH Heidelberg; Berlin; Oxford
- Nicholas FW, Brown SC, Le Tissier PR (1998) Mendelian inheritance in animals (MIA). Sydney, Australia: Department of Animal Science, University of Sydney [Internet] <http://angis.su.oz.au/Database/BIRX/omia/>
- Nicholas FW, Harper PAW (1996) Inherited disorders: the comparative picture. *Austral Vet J* 73, 64-66
- O'Brian SJ, Cevario SJ, Martenson JS, Thompson MA, Nash WG, Chang E, Graves JAM, Spencer JA, Cho KW, Tsujimoto H, Lyons LA (1997) Comparative Gene Mapping in the Domestic Cat (*Felis catus*). *Journal of Heredity* 88, 408-414
- O'Brian SJ, Menotti-Raymond M, Murphy WJ, Yuhki N (2002) The Feline Genome Project. *Annu Rev Genet* 36, 657-686

- O' Leary CA, Ghoddusi M, Huxtable CR (2002) Renal pathology of polycystic kidney disease and concurrent hereditary nephritis in Bull Terriers. *Aust Vet* 80 (6), 353-361
- Olsson PS, Lohning C, Horsley S, Kearney L, Harris PC, Frischauf AM (1996) The mouse homologue of the polycystic kidney disease gene (PKD1) is a single-copy gene. *Genomics* 34, 233-235
- Orta M, Suzuki Y, Sekiya T, Hayashi K (1989) Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphism using the polymerase chain reaction. *Genomics* 5, 874-879
- Parnell SC, Magenheimer BS, Maser RL, Rankin CA, Smine A, Okamoto T (1998) The polycystic kidney disease-1 protein, polycystin-1, binds and activates heterotrimeric G-protein in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 251, 625-631
- Pearl B, Gamble V, Strong C (1997) Identification of mutations in the duplicated region of the polycystic kidney disease 1 gene (PKD1) by a novel approach. *Am J Hum Genet* 60, 1399-1410
- Peral B, Gamble V, San Millan JL (1995) Splicing mutations of the polycystic kidney disease 1 (PKD1) gene induced by intronic deletion. *Hum Mol Genet* 4, 569-574
- Peral B, San Millan JL, Ong AC (1996) Screening the 3' region of the polycystic kidney disease 1 (PKD1) gene reveals six novel mutations. *Am J Hum Genet* 58, 86-96
- Peters DJ, Sandkuijl LA (1992) Genetic heterogeneity of polycystic kidney disease in europe. *Contrib nephrol* 97, 128-139
- Piontek KB, Germino GG (1999) Murine PKD1 introns 21 and 22 lack the extreme polypyrimidine bias present in human PKD1. *Mamm Genome* 10, 194-196
- PKD Statistic Summary Page [Internet] www.indyweb.net/~lucky/stats.html
- Qian F, Germino FJ (1997) Mistakes happen: Somatic mutations and diseases. *Am J Hum Genet* 61, 1000-1005
- Qian F, Germino FJ, Cai Y, Zhang X, Somlo S, Germino GG (1997) PKD interacts with PKD2 through a probable coiled-coil domain. *Nature Genet* 16, 179-183
- Qian F, Watnik TJ, Onuchic LF, Germino GG (1996) The molecular basis of focal cyst formation in human autosomal dominant polycystic kidney disease type I. *Cell* 87, 979-987

- Ravine D, Gibson RN, Forrest SM, Richards R, Friend K, Sheffield LJ, Kincaid-Smith P, Danks DM (1992) Phenotype and genotype heterogeneity in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Lancet* 340, 1330-1333
- Ravine D, Gibson RN, Walker RG, Sheffield LJ, Kincaid-Smith P, Danks DM (1994) Evaluation of ultrasonographic diagnostic criteria for autosomal dominant polycystic kidney disease. *The Lancet* 343, 824-827
- Reeders ST, Breuning MH, Davies KE (1985) A highly polymorphic DNA marker linked to adult polycystic kidney disease on chromosome 16. *Nature* 317, 542-544
- Reysenbach AL, Giver LJ, Wickham GS, Pace NR (1992) Differential amplification of rRNA genes by polymerase chain reaction. *Appl Environ Microbiol.* 58 (10), 3417-3418
- Robinson R (1977) *Genetics for Cat Breeders*. Pergamon, New York
- Roelfsema JH, Peters DJ, Breuning MH (1996) Detection of translation terminating mutations in the PKD1 gene. *Nephrol Dial Transplant* 11 (Suppl 6), 5-9
- Roest PA, Roberts RG, Sugino S, Van Ommen GL, Den Dunnen JT (1993) Protein truncation test (PTT) for rapid detection of translation-terminating mutations. *Hum Mol Genet* 2, 1719-1721
- Rossetti S, Bresin E, Restagno G (1996) Autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD) in an Italian family carrying a novel nonsense mutation and two missense changes in Exon 44 and 45 of the PKD1 Gene. *Am J Med Genet* 65, 155-159
- RVDE e.V., Regional-Verband deutscher Edelkatzenzüchter (2000) Nierenzysten oder PKD. [Internet] www.rvde.de/Aktuell/PKD/Nierenzysten/nierenzysten.html
- Saiki RK, Scharf SJ, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N (1985) Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230, 1350-1354
- Schneider MC, Rodriguez AM, Nomura H, Zhou J, Morton CC, Reeders ST, Weremowicz S (1996) A gene similar to PKD1 maps to chromosome 4q22: a candidate gene for PKD2. *Genomics* 38, 1-4
- Schüler L, Swalve H, Götz KU (2000) *Grundlagen der Quantitativen Genetik*. Verlag Eugen Ulmer Stuttgart
- Schwiebert EM, Wallace DP, Braunstein GM, King SR, Peti-Peterdi J, Hanaoka K (2002) Autocrine extracellular purinergic signalling in epithelial cells derived from polycystic kidneys. *Am J Physiol Renal Physiol* 282, F763-775

- Sessa A, Ghiggeri GM, Turco AE (1997) Autosomal dominant polycystic kidney disease: clinical and genetic aspects. *J N* 10 (6), 295-310
- Shokeir MHK (1978) Expression of adult polycystic kidney disease in childhood: a longitudinal study. *Clin. Genet.* 14, 61-72
- Somlo S, Ehrlich B (2001) Human disease: calcium signalling in polycystic kidney disease. *Curr Biol* 11, R356-360
- Strachan T, Read AP (1996) *Molekulare Humangenetik*. Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg; Berlin; Oxford
- Sutter M, Germino GG (2003) Autosomal dominant polycystic kidney disease: Molecular genetics and pathophysiology. *J Lab Clin Med* 141 (2), 91-106
- Tanase H, Kudo K, Horikoshi H, Mizushima H, Okazaki T, Ogata E (1991) Inherited primary hypothyroidism with thyrotrophin resistance in Japanese cats. *J Endocrinol* 129, 245-251
- The European Polycystic Kidney Disease Consortium (1994) The polycystic kidney disease 1 gene encodes a 14 kb transcript and lies within a duplicated region on chromosome 16. *Cell* 77, 881-894
- The Feline PKD FAQ (1999) Answers to Frequently Asked Questions About Polycystic Kidney Disease in Cats.
[Internet] <http://my.erinet.com/leborado/PKD/pkdfaq.html>.
- The International Polycystic Kidney Disease Consortium (1995) Polycystic Kidney Disease: the complete structure of the PKD1 gene and its protein. *Cell* 81, 289-298
- Torres VE, Wilson DM, Hattery RR, Segura JW (1993) Renal stone disease in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Am J Kidney Dis* 22, 513-519
- Turco AE, Clementi M, Rossetti S, Tenconi R, Pignatti PF (1996) An Italian family with autosomal dominant polycystic kidney disease unlinked to either the PKD1 or PKD2 gene. *Am J Kidney Dis* 28, 759-761
- Turco AE, Rossetti S, Bresin E (1995) A novel nonsense mutation in the PKD1 gene (C3817T) is associated with autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD) in a large three-generation Italian family. *Hum Mol Genet* 4, 1331-1335
- Viana F, de Smedt H, Droogmans G, Nilius B (1998) Calcium signalling through nucleotide receptor P2Y2 in cultured human vascular endothelium. *Cell Calcium* 24, 117-127

- Wang G, Seidman MM, Glezwe PM (1996) Mutagenesis in mammalian cells induced by triplehelix formation and transcription-coupled repair. *Science* 271, 802-805
- Watnick TJ, Torres VE, Gandolph MA, Quian F, Onuchic LF, Klinger KW, Landes G, Germino GG (1998) Somatic mutation in individual liver cysts support a two-hit model of cytogenesis in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Mol Cell* 2, 247-251
- Welling LW, Grantham JJ (1996) Cystic and developmental diseases of the kidney. In Brenner B (Ed.), *The kidney* (pp.1828-1863). Philadelphia: W.B. Saunders Company
- White B (1998) CFA Health Committee: Polycystic Kidney Disease Seminar [Internet] <http://www.cfaine.org/articles/health-pkd-seminar.html>
- White MB, Carvalho M, Derse D, O Brian SJ, Dean M (1992) Detection single base substitution as heteroduplex polymorphism. *Genomics* 12, 301-306
- Wilson PD, Sherwood AC, Palla K, Du J, Watson R, Norman JT (1991) Reverse polarity of NaKATPase: mislocation to apical plasma membranes in polycystic kidney disease epithelia. *Am J Physiol* 260, F420-430
- Woo DDL, Miao SYP, Paleya JC, Woolf AS (1994) Taxol inhibits progression of congenital polycystic kidney disease. *Nature* 368, 750-753
- Wu G, D'Agati V, Cai Y, Markowitz G, Park JH, Reynolds DM, Maeda Y, Le TC, Hou H jr., Kucherlapati R, Edelmann W, Somlo S (1998) Somatic inactivation of PKD2 results in polycystic kidney disease. *Cell* 93, 177-188
- Wu G, Markowitz G, Li L, D'Agati V, Factor S, Geng L, Tibara S, Hu H, Tuchman J, Cai Y, Adelsberg J, Park JH, van Adelsberg J, Kucherlapati R, Edelmann W, Somlo S (2000) Cardiac defects and renal failure in mice with targeted mutation in PKD2. *Nature Genet* 24, 75-78
- Wu G, Mochizuki T, Le TC, Cai Y, Hayashi T, Reynolds DM, Somlo S (1997) Molecular cloning, cDNA sequence analysis and chromosomal location of mouse PKD2. *Genomics* 45, 220-223
- Wu G, Somlo S (2000) Minireview: Molecular Genetics and Mechanism of Autosomal Dominant polycystic Kidney Disease. *Molecular Genetics and Metabolism* 69, 1-15

- Xenophontos S, Constantinides R, Havashi T (1997) A translation frameshift mutation induced by a cytosine in the polycystic kidney disease 2 gene. Hum Mol Genet 6, 949-952
- Yamaguchi T, Nagao S, Kasahara M, Takahashi H, Grantham JJ (1997) Renal accumulation and excretion of cyclic adenosine monophosphate in murine model of slowly progressive polycystic kidney disease. Am J Kidney Dis 30, 703-709
- Ye M, Grantham JJ (1993) The secretion of fluid by renal cysts from patients with autosomal dominant polycystic kidney disease. N Engl J Med 329, 310-313
- Zerres K, Völpel MC, Weiß H (1984) Cystic kidneys. Hum Genet 68, 104-135

10. Anhang

10.1 Tabellenanhang

Tabelle 27: Angaben zu den untersuchten Katzenblutproben

No	D-Nummer	Geb. Datum	PKD	Poly1(Hi nfl)	FCA 476	Geschlecht
1	1970	10.03.1998	negativ		100 / 100	weiblich
2	1971	13.03.1998	negativ	Hh		weiblich
3	1972	07.10.1997	negativ	hh	100 / 100	männlich
4	1973	28.03.1998	negativ	hh	100 / 99	weiblich
5	1974	24.07.1997	negativ	Hh		weiblich
6	1975	08.02.1998	positiv	hh	100 / 100	weiblich
7	1976	03.06.1996	positiv	hh	100 / 99	männlich
8	1977	09.02.1992	positiv	hh	100 / 100	weiblich
9	1978	03.06.1996	positiv	hh	100 / 100	weiblich
10	1979	11.08.1997	negativ	hh	100 / 99	männlich
11	1980	10.12.1995	positiv	hh	100 / 99	weiblich
12	1981	19.10.1991	positiv	hh	100 / 99	männlich
13	1982	08.08.1996	unbekannt	Hh	101 / 100	männlich
14	1983	05.06.1998	positiv	hh	100 / 100	weiblich
15	1984	24.07.1997	positiv	hh	100 / 99	männlich
16	1985	05.06.1998	positiv	hh	100 / 100	weiblich
17	1986	29.04.1997	positiv	hh	101 / 100	weiblich
18	1987	27.06.1997	negativ	hh	101 / 100	männlich
19	1988	06.07.1997	positiv	hh	101 / 100	weiblich
20	1989	28.10.1993	positiv	Hh	100 / 100	weiblich
21	1990	17.12.1995	positiv	hh	102 / 100	weiblich

22	1991	18.05.1997	positiv	hh	101 / 100	männlich
23	1992	26.02.1998	positiv	hh	102 / 100	unbekannt
24	1993	09.06.1997	positiv	Hh	100 / 100	männlich
25	1994	22.04.1998	negativ	hh	100 / 100	unbekannt
26	1995		positiv	hh	100 / 99	unbekannt
27	1996		unbekannt	hh	100 / 100	unbekannt
28	1997		positiv	hh	100 / 99	unbekannt
29	1998		positiv	hh	100 / 100	unbekannt
30	1999		positiv	hh	100 / 100	männlich
31	2000	07.07.1993	negativ	hh	102 / 100	weiblich
32	2001	19.02.1997	positiv			weiblich
33	2002	11.07.1997	negativ	hh	100 / 100	männlich
34	2003	04.06.1997	positiv	hh	100 / 100	männlich
35	2004	27.06.1996	positiv	hh	100 / 100	weiblich
36	2005	17.01.1996	positiv	hh	100 / 99	weiblich
37	2006	15.05.1993	positiv	hh	100 / 99	weiblich
38	2007	26.12.1995	negativ	Hh	102 / 100	weiblich
39	2008	09.02.1998	negativ	hh	102 / 100	weiblich
40	2009	27.05.1996	positiv	hh	100 / 100	männlich
41	2010	31.07.1996	positiv	hh	100 / 100	weiblich
42	2011	24.03.1995	positiv	hh	100 / 99	männlich
43	2012	14.08.1996	positiv	hh	100 / 100	männlich
44	2013	08.03.1997	negativ	Hh	100 / 99	weiblich
45	2014	20.11.1995	negativ	Hh	100 / 100	weiblich
46	2015	16.06.1996	positiv	Hh	101 / 100	männlich
47	2016	18.05.1997	positiv	hh	100 / 99	männlich
48	2017	30.09.1995	positiv	hh	100 / 99	weiblich
49	2018	11.09.1998	positiv	hh	100 / 100	männlich
50	2019	31.08.1996	positiv	hh	100 / 100	weiblich
51	2020	13.05.1998	positiv	Hh	101 / 100	weiblich
52	2021	27.06.1997	negativ	hh	100 / 100	männlich
53	2022		negativ	Hh	101 / 99	unbekannt
54	2023	24.06.1998	positiv	hh	100 / 100	männlich
55	2024	29.05.1995	positiv	hh	100 / 99	weiblich
56	2025		unbekannt	hh		unbekannt
57	2026	01.06.1996	positiv	hh	100 / 99	männlich
58	2027	23.03.1996	negativ	hh	99 / 99	weiblich
59	2028	10.05.1997	negativ	hh		weiblich
60	2029	30.05.1993	positiv	hh		weiblich
61	2030	30.04.1996	negativ	Hh	102 / 101	weiblich
62	2031	06.01.1996	negativ	Hh	100 / 99	weiblich
63	2032	20.05.1997	positiv	hh	100 / 100	weiblich
64	2033	10.10.1996	positiv	hh	100 / 100	männlich
65	2034	13.05.1998	positiv		102 / 100	männlich
66	2035	19.07.1997	negativ	HH	99 / 97	männlich
67	2036		positiv	hh	101 / 100	männlich
68	2037	05.01.1996	positiv	Hh	100 / 100	weiblich
69	2038	30.05.1993	negativ	hh	100 / 99	weiblich
70	2039	13.02.1993	negativ	Hh	100 / 100	weiblich

71	2040	23.07.1997	positiv	hh	99 / 99	männlich
72	2041	18.05.1995	negativ	hh	100 / 99	weiblich
73	2042	17.07.1993	positiv	Hh	101 / 100	männlich
74	2043	23.07.1997	negativ	hh	100 / 99	weiblich
75	2044	21.08.1996	negativ	hh	100 / 99	männlich
76	2045	10.09.1995	negativ	hh	102 / 100	weiblich
77	2046	05.03.1997	positiv	hh	100 / 100	weiblich
78	2047	04.05.1998	positiv	hh	100 / 100	weiblich
79	2048	04.04.1990	negativ	hh	100 / 99	weiblich
80	2049	20.08.1993	positiv	hh	100 / 100	männlich
81	2050	02.04.1996	positiv	hh	102 / 100	männlich
82	2051	14.04.1993	positiv	hh	100 / 99	männlich
83	2052	01.07.1993	negativ	Hh	100 / 100	weiblich
84	2053	24.08.1993	negativ	hh	100 / 99	weiblich
85	2054	26.08.1993	negativ	hh	100 / 100	weiblich
86	2055	31.05.1995	positiv	hh	100 / 100	weiblich
87	2056	24.03.1996	negativ	Hh		weiblich
88	2057	30.04.1996	negativ	hh	100 / 99	weiblich
89	2058	24.08.1993	positiv		100 / 100	männlich
90	2059	09.05.1996	positiv	Hh		weiblich
91	2060	17.12.1993	positiv	hh	100 / 100	weiblich
92	2061	25.01.1998	negativ	hh	100 / 100	männlich
93	2062	26.07.1998	negativ	hh	100 / 99	weiblich
94	2063	24.08.1994	positiv	hh	100 / 100	weiblich
95	2064	25.06.1994	negativ	hh	99 / 99	weiblich
96	2065	25.06.1994	positiv	hh	100 / 100	weiblich
97	2067	25.06.1994	positiv	hh	100 / 99	weiblich
98	2068	01.09.1997	positiv	hh	100 / 100	männlich
99	2069	27.07.1995	positiv	hh	100 / 100	männlich
100	2070	07.01.1993	negativ	Hh	100 / 99	männlich
101	2071	07.01.1993	negativ		100 / 99	männlich
102	2072	15.12.1998	negativ		100 / 99	weiblich
103	2073	30.08.1998	positiv	Hh	100 / 97	weiblich
104	2074	24.07.1998	positiv		100 / 99	weiblich
105	2075	30.06.1997	positiv	hh	100 / 99	weiblich
106	2076	05.05.1996	negativ	hh	99 / 99	weiblich
107	2077	29.07.1998	negativ	hh	102 / 99	männlich
108	2078	28.08.1998	negativ	hh	102 / 99	weiblich
109	2079	28.08.1998	negativ	hh	102 / 100	weiblich
110	2080	29.07.1998	positiv	hh	100 / 99	männlich
111	2081	18.07.1998	positiv	hh	100 / 99	männlich
112	2082	08.07.1998	positiv	hh	102 / 100	männlich
113	2083	17.05.1998	positiv		100 / 100	weiblich
114	2084	15.05.1998	positiv	hh	100 / 99	männlich
115	2085	02.08.1995	negativ	Hh	100 / 99	weiblich
116	2086	27.07.1995	negativ	hh	99 / 99	weiblich
117	2087	20.04.1998	negativ	hh	99 / 99	männlich
118	2088	27.10.1994	negativ	Hh	100 / 100	weiblich
119	2089	18.04.1995	positiv	hh	100 / 100	weiblich

120	2090	28.08.1998	positiv	hh	100 / 99	männlich
121	2092	30.08.1998	negativ	HH	100 / 97	weiblich
122	2551	22.06.1990	negativ	hh	102 / 100	weiblich
123	2552		negativ	hh	100 / 99	weiblich
124	2553	02.08.1999	negativ	hh		weiblich
125	2554	09.03.1999	positiv	hh	100 / 100	männlich
126	2555		negativ	hh		unbekannt
127	2556		positiv			unbekannt
128	2557		negativ			unbekannt
129	2558		positiv			unbekannt
130	2559		positiv			unbekannt
131	2560		negativ			unbekannt
132	2561		positiv	hh		unbekannt
133	2562		unbekannt	hh		unbekannt
134	2563		negativ	Hh	100 / 97	männlich
135	2564	16.03.1997	negativ		97 / 97	weiblich
136	2565	25.07.1999	positiv	hh	100 / 100	weiblich
137	2566	20.09.1988	positiv	hh	100 / 100	weiblich
138	2567		positiv			unbekannt
139	2568		positiv		100 / 100	unbekannt
140	2569		negativ			unbekannt
141	2570		positiv			unbekannt
142	2571	15.12.1998	positiv	hh	100 / 100	männlich
143	2572	01.08.1998	negativ	Hh	100 / 99	weiblich
144	2573	21.07.1995	negativ	hh	100 / 97	weiblich
145	2574		negativ			unbekannt
146	2575		negativ	hh	102 / 100	weiblich
147	2576	22.03.1997	negativ		100 / 100	männlich
148	2577	1994	positiv			weiblich
149	2578	04.06.1999	negativ	Hh	100 / 100	männlich
150	2579	10.05.1998	positiv	Hh	100 / 97	weiblich
151	2580	26.05.1997	positiv	Hh	100 / 98	männlich
152	2581	04.05.1996	positiv	hh	100 / 100	männlich
153	2582	20.04.1998	negativ	hh	99 / 99	weiblich
154	2583	27.02.1998	negativ	hh	102 / 97	weiblich
155	2584	04.04.1994	positiv	Hh	100 / 100	weiblich
156	2585	08.07.1998	negativ	hh	102 / 100	weiblich
157	2586	30.08.1998	negativ	Hh	100 / 97	weiblich
158	2587	18.07.1998	negativ	hh	102 / 99	weiblich
159	2588	24.03.1997	positiv	hh	100 / 100	weiblich
160	2589	21.06.1998	negativ	hh	102 / 100	männlich
161	2590	16.03.1997	negativ	hh	102 / 100	männlich
162	2591	18.05.1998	negativ	Hh		weiblich
163	2592	03.05.1997	negativ	hh	100 / 100	weiblich
164	2593	13.08.1996	positiv	hh	100 / 100	männlich
165	2594	16.06.1997	negativ	Hh	101 / 100	weiblich
166	2595		positiv	hh	102 / 100	männlich
167	2596	18.09.1997	negativ	hh	102 / 100	weiblich
168	2597	02.06.1998	negativ	hh	102 / 100	weiblich

169	2598	20.03.1996	negativ	Hh	100 / 99	weiblich
170	2599	11.08.1997	negativ	hh	100 / 99	weiblich
171	2600	20.05.1993	negativ	Hh	102 / 100	männlich
172	2601	21.06.1998	positiv	hh	102 / 100	männlich
173	2603	11.09.1999	negativ	hh	100 / 99	weiblich
174	2604	18.06.1999	positiv	hh	100 / 99	weiblich
175	2605	28.08.1999	negativ	Hh	99 / 99	männlich

Aus Datenschutzgründen wurde den einzelnen Tieren, von denen die untersuchten Blutproben stammten, D-Nummern zugewiesen. In der Spalte PKD sind die Ergebnisse der Ultraschalluntersuchung, hinsichtlich dem Vorhandensein von Nierenzysten, aufgeführt. Die Spalte Hinf I beinhaltet, die ermittelten Ergebnisse aus der Restriktionsanalyse mit dem Enzym Hinf I, wobei HH homozygot für die Schnittstelle, Hh heterozygot für die Schnittstelle und hh homozygot keine Schnittstelle bedeutet. In der Spalte FAC 476 sind die Ergebnisse aus der Untersuchung des Markergenortes aufgelistet die Zahlen stehen jeweils für eine Allelvariante.

10.2 PCR Programme

Tabelle 28: Touchdown PCR Programm für die Primer PKD9-11f1 und PKD9-11b1

		Temperatur	Dauer	Zyklen
Stage 1	Step 1	95°C	15 min	1
Stage 2	Step 1	94°C	1 min	2
	Step 2	65°C	1 min	
	Step 3	72°C	1 min	
Stage 3	Step 1	94°C	1 min	2
	Step 2	60°C	1 min	
	Step 3	72°C	1 min	
Stage 4	Step 1	94°C	1 min	2
	Step 2	55°C	1 min	
	Step 3	72°C	1 min	
Stage 5	Step 1	94°C	1 min	35
	Step 2	50°C	1 min	
	Step 3	72°C	1 min	
Stage 6	Step 1	72°C	5 min	1
Stage 7	Step 1	25°C	1 min	1

Tabelle 29: PCR Program für die Primer PKDDOG 1 und PKDDOG 2

		Temperatur	Dauer	Zyklen
Stage 1	Step 1	95°C	15 min	1
Stage 2	Step 1	94°C	1 min	2
	Step 2	72°C	1 min	
	Step 3	72°C	1 min	
Stage 3	Step 1	94°C	1 min	2
	Step 2	69°C	1 min	
	Step 3	72°C	1 min	
Stage 4	Step 1	94°C	1 min	2
	Step 2	67°C	1 min	
	Step 3	72°C	1 min	
Stage 5	Step 1	94°C	1 min	35
	Step 2	65°C	1 min	
	Step 3	72°C	1 min	
Stage 6	Step 1	72°C	5 min	1

PCR Programme für die Seminested PCR mit den Primern PKDDOG 1, PKDDOG 2 und PKDDOG 3

Tabelle 30: Touchdown Programm der 1.PCR für die Primer PKDDOG 1 und PKDDOG 2

		Temperatur	Dauer	Zyklen
Stage 1	Step 1	95°C	15 min	1
Stage 2	Step 1	94°C	30 s	5
	Step 2	72°C	45 s	
Stage 3	Step 1	94°C	30 s	30
	Step 2	69°C	30 s	
	Step 3	72°C	45 s	
Stage 4	Step 1	72°C	5 min	1
Stage 5	Step 1	4°C	∞	1

Tabelle 31: PCR Programm der 2.PCR für die Primer PKDDOG 3 und PKDDOG 2

		Temperatur	Dauer	Zyklen
Stage 1	Step 1	95°C	15 min	1
Stage 2	Step 1	94°C	30 s	30
	Step 2	67°C	30 s	
	Step 3	72°C	45 s	
Stage 3	Step 1	72°C	5 min	
Stage 4	Step 1	4°C	∞	1

Tabelle 32: PCR Programm für die Primer CAT476F und CAT476R

		Temperatur	Dauer	Zyklen
Stage 1	Step 1	95°C	13,5 min	1
Stage 2	Step 1	94°C	15 s	15
	Step 2	55°C	30 s	
	Step 3	72°C	30 s	
Stage 3	Step 1	89°C	15 s	10
	Step 2	55°C	30 s	
	Step 3	72°C	30 s	
Stage 6	Step 1	72°C	3 min	1
Stage 7	Step 1	4°C	∞	1

Tabelle 33: PCR Programm für die radioaktive Markierung:

		Temperatur	Dauer	Zyklen
Stage 1	Step 1	95°C	13,5 min	1
Stage 2	Step 1	94°C	15 s	15
	Step 2	55°C	15 s	
	Step 3	72°C	30 s	
Stage 3	Step 1	72°C	2 min	
Stage 4	Step 1	4°C	∞	1

Danksagung

Für die Möglichkeit der Erstellung dieser Dissertation und für die Überlassung des Themas danke ich Herrn Prof. Dr. A. Herzog, Leiter des Institut für Tierzucht und Haustiergenetik, Fachgebiet Veterinärmedizinische Genetik und Zytogenetik der Justus-Liebig-Universität Gießen.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. W. Hecht für die freundliche Betreuung dieser Arbeit, die umfassende Einführung in die Molekulargenetik und die zahlreichen Anregungen bei der Auswertung und Diskussion der Daten. Seine intensive und stets hilfsbereite Betreuung trug wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit bei.

Für die Überlassung des Probenmaterials und der Befunde aus den sonographischen Untersuchungen bedanke ich mich bei Herrn Dr. Martin Gerwing und seinem Team der Chirurgischen Veterinärklinik der Justus-Liebig-Universität Gießen.

Für die Unterstützung, vor allem in methodischen Fragen, danke ich Herrn Winkler, sowie Herrn Dr. Klaus Volmer der mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite stand.

Für die Korrektur meiner Promotionsarbeit bedanke ich bei Renate Helmig, Horst H.Helmig und Thomas Balsler.

Besonderer Dank gilt meiner Schwester Viviane Helmig für die große Unterstützung bei computertechnischen Fragen und dafür dass sie immer Zeit für mich gefunden hat, wenn ich sie brauchte. Ich kann mir keine bessere Schwester vorstellen.

Der Mitdoktorandin Silke Block, danke ich für die moralische Unterstützung und erwiesene Freundschaft.

Für die vielen Aufmunterungen und die Unterstützung während der gesamten Doktorarbeit gilt mein besonderer Dank Frau Ratzner, die immer eine Tasse Kaffee und ein offenes Ohr für mich übrig hatte.

Zu guter Letzt einen herzlichen Dank an meine Eltern, die mir ein großer Rückhalt waren und sind. Insbesondere für Ihre liebevolle Unterstützung während der Zeit meines Studiums und der Doktorarbeit. Ohne Ihre große Unterstützung wäre beides undenkbar gewesen.

édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
GLEIBERGER WEG 4
D-35435 WETTENBERG

Tel: +49-(0)6406-4413 Fax: -72757
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN 3-89687-429-2



9 783896 874290