

Alexander Zeilner

hereditäre fokal segmentale Glomerulosklerose (FSGS)

Typ1

molekularbiologische Sequenzanalyse des alpha-
Aktinin-4-Gens

Alexander Zeilner

hereditäre fokal segmentale Glomerulosklerose (FSGS) Typ1

Alexander Zeilner

hereditäre fokal segmentale Glomerulosklerose (FSGS) Typ1

**molekularbiologische Sequenzanalyse des
alpha-Aktinin-4-Gens**

VDM Verlag Dr. Müller

Vorwort

Für Manuela Födinger und Corinna Eberle:

Dieses Buch ist auf Basis meiner Diplomarbeit zur Erlangung des akademischen Grades „Magister der Naturwissenschaften“ an der Universität Wien entstanden. Auch mehr als zwei Jahre nach dem erfolgreichen Abschluss meines Biologiestudiums, das ich neben meiner beruflichen Tätigkeit als Turnusarzt in Ausbildung zum Arzt für Allgemeinmedizin absolviert habe, denke ich sehr gerne an die interessante, lehrreiche und schöne Zeit zurück, die ich im Rahmen dieser Arbeit mit Euch im Labor verbringen durfte.

Garsten im Mai 2010

Dr. Mag. Alexander Zeilner

„Wer aufhört, besser werden zu wollen, hört auf,
gut zu sein“

Nach Marie von Ebner-Eschenbach

Es ist eine Freude, Sie zu diesem Buch zu begrüßen.

Das Buch ist ein Ergebnis der Zusammenarbeit von Autoren und Herausgebern. Es enthält viele wertvolle Informationen, die Ihnen bei Ihrer Arbeit helfen werden. Wir hoffen, dass Sie es mit Interesse und Freude lesen werden. Das Buch ist in drei Teile gegliedert. Der erste Teil enthält allgemeine Informationen über die Thematik. Der zweite Teil enthält detaillierte Informationen über die verschiedenen Aspekte der Thematik. Der dritte Teil enthält praktische Hinweise und Beispiele. Wir hoffen, dass Sie das Buch als wertvolle Ressource für Ihre Arbeit betrachten werden.

Die Autoren und Herausgeber

Das Buch ist in drei Teile gegliedert.

Was ist das? Es ist ein Buch, das Ihnen hilft, Ihre Arbeit zu verbessern. Es enthält viele wertvolle Informationen, die Ihnen bei Ihrer Arbeit helfen werden. Wir hoffen, dass Sie es mit Interesse und Freude lesen werden.

Es ist eine Freude, Sie zu diesem Buch zu begrüßen.

Abstrakt

Die fokale segmentale Glomerulosklerose (FSGS) ist eine Nierenerkrankung, bei der durch fortschreitende Sklerosierungsprozesse die Glomerula sukzessive funktionsunfähig werden und die betroffenen PatientInnen eine renale Insuffizienz mit Dialysepflichtigkeit entwickeln. Von genetisch determinierten primären Formen (Typ 1 – 3) werden sekundäre Formen unterschieden.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Mutationssuche im *ACTN4*-Gen, das für alpha-Aktinin-4, einem Strukturprotein der renalen Podozyten, kodiert und welches für die reguläre Funktion des glomerulären Filters verantwortlich zeichnet. Mutationen im *ACTN4* Gen sind mit einer FSGS vom Typ 1 assoziiert. Auf Basis klinischer Befunde bestand bei einer Familie mit renaler Niereninsuffizienz der Verdacht auf eine hereditäre FSGS. Die zentrale Frage unserer Arbeit war, ob Mutationen im *ACTN4* Gen für die familiäre Niereninsuffizienz verantwortlich sind.

Zunächst wurde mit 3 überlappenden PCR Systemen die kodierende Sequenz auf cDNA Ebene analysiert. Auf Grund von Splicing-Varianten fanden sich zum Teil überlappende, nicht lesbare Sequenzen, weshalb für alle 21 Exons des *ACTN4* Gens PCR-Systeme auf DNA-Basis etabliert wurden. Beim Vergleich der Nukleotidsequenz der PatientInnen mit einer Referenzsequenz wurden die folgenden Mutationen identifiziert: *ACTN4* 605C>T (heterozygote Mutation im Exon 5, AAC>AAT; N182N), *ACTN4* 596G>A (heterozygote Mutation im Exon 5 GTA>ATA; P179P) und *ACTN4* 2622T>C (heterozygote Mutation im Exon 20, TTA>CTA; L855L). Alle drei Mutationen stellen bekannte genetische Polymorphismen dar. Exon 1 konnte nicht auf Mutationen untersucht werden, da mit dem eingesetzten (publizierten) Analysesystem kein geeignetes PCR Produkt generiert werden konnte. Derzeit sind weitere Arbeiten im Gange, ein Testsystem für die Untersuchung von Exon 1 zu entwickeln. Unsere Daten zeigen, dass die terminale Niereninsuffizienz in der analysierten Familie nicht mit Mutationen im Exon 2-21 des *ACNT4* Gens assoziiert ist.

Einleitung

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit dem Krankheitsbild der **fokal segmentalen Glomerulosklerose (FSGS)**, einer Nierenerkrankung, die durch das Auftreten einer anfangs milden **Proteinurie** gekennzeichnet ist und zu einer **terminalen Niereninsuffizienz** mit Dialysepflichtigkeit bzw. Transplantationsindikation führen kann. Das klinische Bild kann durch verschiedenste Ursachen hervorgerufen werden. Neben den primären genetischen Formen sind auch eine Vielzahl so genannter sekundärer Formen von FSGS zu beobachten. Hierzu zählen histologisch nicht von den primären Formen zu unterscheidende Veränderungen, wie sie etwa bei Diabetes mellitus, Adipositas und HIV-Infektion auftreten.

Wie sich bereits aus dem Terminus „fokal segmentale Glomerulosklerose“ ableiten lässt, ist die Erkrankung definitionsgemäß durch das Auftreten von sklerotischen Veränderungen vereinzelter Glomerula im Nierenparenchym gekennzeichnet. Neben affizierten Glomerula sind auch histologisch und funktionell normale Glomerula zu beobachten. Insgesamt gestaltet sich die lichtmikroskopische Diagnostik abhängig vom Stadium der Erkrankung als nicht immer einfach, da der Großteil der veränderten Glomerula zu Beginn in den Randbezirken des Parenchyms, also subkapsulär zu finden sind und bei ungünstigem Verlauf des Stanzkanals die betroffenen Areale nicht adäquat repräsentiert und histologisch aufgearbeitet werden können. Zudem erlaubt die lichtmikroskopische Befundung naturgemäß keine Differenzierung gegenüber anderen genetisch determinierten Nierenerkrankungen, die wie die oben angeführten primären Formen der FSGS zu pathologisch veränderten Strukturproteinen führen. In **Tabelle 1** wird für die differentialdiagnostisch relevanten Erkrankungen ein Überblick gegeben. Die folgenden Abbildungen zeigen das charakteristische Bild der FSGS, wie sie lichtmikroskopisch in Nierenbiopsaten Betroffener zu finden sind.

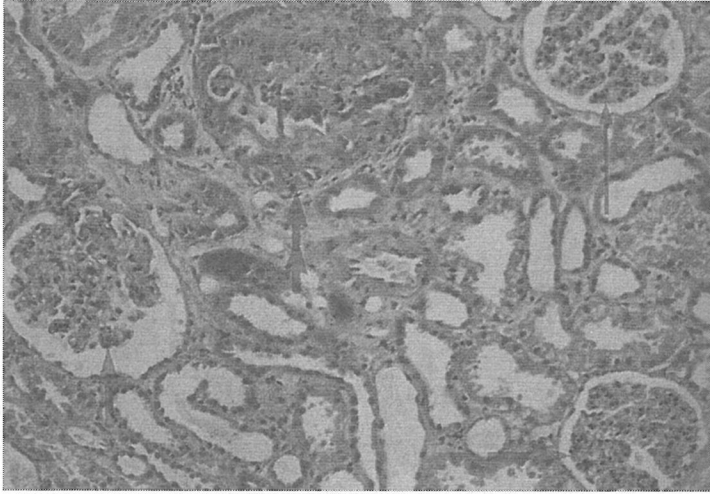


Abb.1. Histologischer Befund der FSGS in der Nierenbiopsie

Die Pfeile zeigen das charakteristische Nebeneinander von mehr oder weniger stark sklerosierten neben unauffälligen Glomerula (HE-Färbung) (aus Curran-Crocker, Atlas der Histopathologie, 5. Auflage, Springer-Verlag)

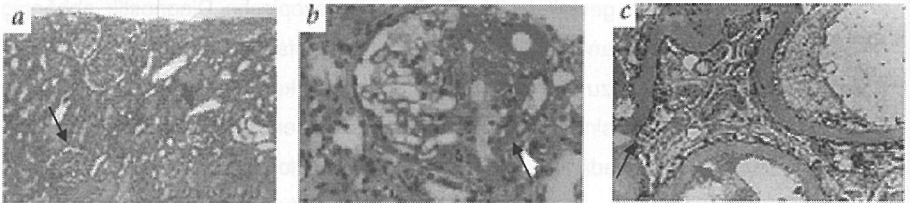


Abb.2. Nierenbiopsien eines Patienten mit FSGS (PAS-Färbung)

Abbildung 2a.

Übersichtsvergrößerung mit relativ normalen glomerulären Strukturen (Pfeil links) und einem betroffenen Glomerulum (Pfeil rechts)

Abbildung 2b.

pathologisch verändertes Glomerulum mit typischem Skleroseherd am rechten Rand (siehe Pfeil)

Abbildung 2c.

elektronenmikroskopische Aufnahme; die Basalmembran erscheint intakt ohne Hinweise auf Immunkomplexablagerungen; neben normalen Podozytenfortsätzen (Pfeil links) erscheinen einzelne Podozytenfortsätze pathologisch konfiguriert (Pfeil rechts)

Bei den **primären, genetisch** determinierten Formen werden insgesamt drei Typen unterschieden (FSGS 1 bis FSGS 3). Dabei handelt es sich um autosomal dominant bzw. autosomal rezessiv vererbte Gendefekte mit variabler Penetranz, die in weiterer Folge zu den bereits eingangs beschriebenen klinisch und histologisch fassbaren Veränderungen führen.

Allen drei genetisch determinierten Formen der FSGS ist gemeinsam, dass die zugrunde liegenden Gendefekte, die in weiterer Folge vorgestellt werden sollen, zu Veränderungen **zytoskeletärer Strukturproteine** führen, die innerhalb der Glomerula der Niere den Aufbau und die geordnete Funktion der Filtrationsbarriere bewirken. Zunächst soll in der unten stehenden Abbildung die anatomische und histologische Lokalisation der in der Folge erläuterten Veränderungen der glomerulären Filtrationsbarriere veranschaulicht werden:

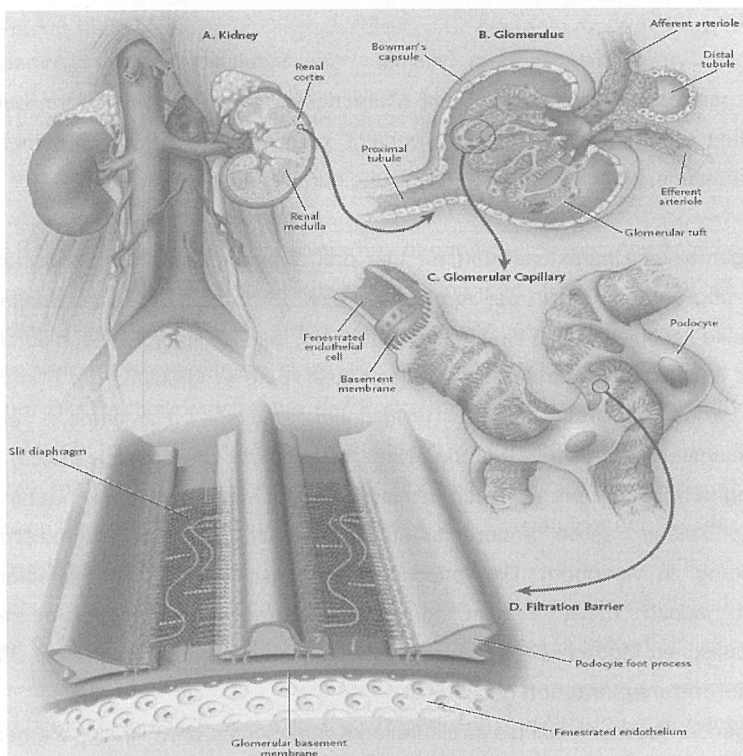


Abb. 3. anatomische und strukturelle Komponenten der glomerulären Filtrationsbarriere

Die **glomeruläre Filtrationsbarriere** (die Glomerula liegen im Nierenkortex) ist aus drei Schichten aufgebaut: fenestriertes Endothel, glomeruläre Basalmembran und Podozyten, die durch so genannte Fußfortsätze miteinander verzahnt sind. Die Filtrationsbarriere wirkt größen- und ladungsselektiv. Auf molekularer Basis sind für die reguläre Funktion des fenestrierten Endothels vornehmlich negativ geladene Sialoproteine und Proteoglykane, die in die Glykokalix an der Oberfläche der Endothelzelle integriert sind, verantwortlich.

Die glomeruläre Basalmembran selbst ist eine azelluläre Matrix mit einem Durchmesser von ca. 300 - 350 nm. Hauptkomponenten stellen das Kollagen Typ IV, Proteoglykane, Laminin und Nidogen dar. Speziell die gitterartige Konfiguration der Kollagenfasern ist funktionell von größter Bedeutung, wobei sich jedoch in den letzten Jahren zunehmend herauskristallisiert, dass die ursprünglich vermutete Bedeutung für Größen- und Ladungsselektivität nicht die entscheidende Aufgabe des Kollagen Typ IV ist, sondern vielmehr die Stabilisierung des glomerulären Filterapparates im Vordergrund steht (Anmerkung: beim Alport-Syndrom, bei dem eine Mutation des Typ IV Kollagens vorliegt, manifestiert sich klinisch vornehmlich eine Hämaturie, wohingegen eine Proteinurie nur mild ausgeprägt ist).

Als allgemeines Charakteristikum für alle drei Typen ist eine **Manifestation** der Erkrankung vornehmlich in der Adoleszenz bzw. im frühen Erwachsenenalter. Als Erstmanifestation zeigt sich eine milde Proteinurie, die sich laborchemisch durch eine erhöhte Mikroalbuminexkretion nachweisen lässt. Eine Progredienz der Erkrankung lässt sich **laborchemisch** (Proteinurie, selten Hämaturie, erhöhte Mikroalbuminexkretion im 24-Stunden-Harn, verminderte Creatinin-Clearance) sowie **histologisch** verifizieren. Therapeutische Optionen sind die Gabe von Glukokortikoiden, sowie andere Immunsuppressiva, um die Progredienz der Erkrankung zu verzögern. Die fortschreitende Einschränkung der Nierenfunktion mündet jedoch meist in ein terminales Nierenversagen. Die derzeitigen therapeutischen Möglichkeiten in diesem Stadium der Erkrankung sind auf **Dialyse** bzw. **Nierentransplantation** beschränkt.

Die folgende Abbildung soll die strukturellen Komponenten der Filtrationsbarriere mit ihrer sterischen Anordnung veranschaulichen:

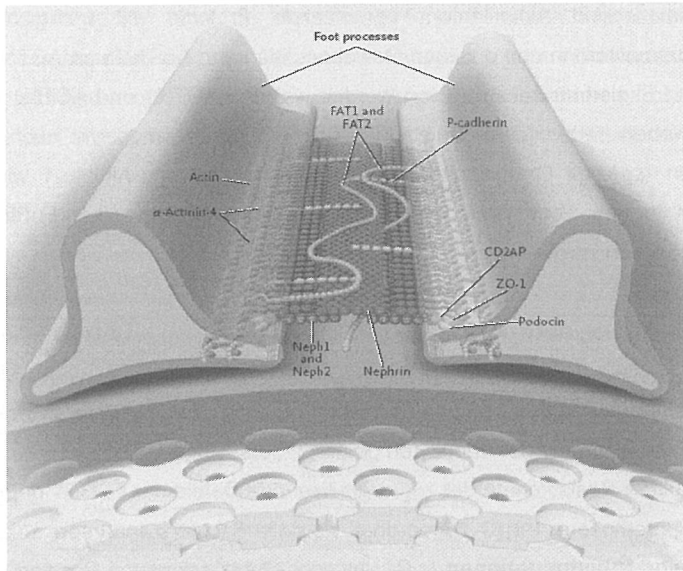


Abb. 4. strukturelle Komponenten der glomerulären Filtrationsbarriere

Neben Kollagen spielen auch Laminine (hetero-trimäre-Proteine) eine entscheidende Rolle, welche auch als Adhaesionsmoleküle an der Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktion beteiligt sind. Die durch die Podozyten gebildete dritte Schicht der glomerulären Filtrationsbarriere spielt die wichtigste und direkteste Rolle bei der Filtration. Die Proteinkomponenten der Podozyten bilden einen Komplex, der eine dünne Membran zwischen den Fußfortsätzen der Podozyten aufbaut und die Membran mit dem aktiven Zytoskelett der Podozyten verbindet. Defekte einzelner Proteinkomponenten führen in weiterer Folge zur Entstehung der bei der FSGS typischen Proteinurie.

Am Aufbau des oben genannten Proteinkomplexes sind vornehmlich Nephrin, Nef 1 und Nef 2, Fat 1 und Fat 2, Podocin, CD2AP, sowie andere Proteine beteiligt.

Bei der hereditären FSGS vom Typ 1 - 3 zeigen sich nun Störungen der am Aufbau des podozytären Proteinkomplexes beteiligten Komponenten. Im Falle der **FSGS 1**, welche durch **Mutationen im ACTN4 Gen** charakterisiert ist, ist das **Alpha-Aktinin-4-Protein** verändert.

Alpha-Aktinine sind Aktinfilament vernetzende Proteine mit unterschiedlichen Expressionsmustern in den diversen Geweben. Während ACTN2 und ACTN3 nur im Herz – und Skelettmuskel exprimiert werden, werden ACTN1 und ACTN4 in vielen Körpergeweben unterschiedlich stark exprimiert, unter anderem auch in den Leukozyten (speziell Granulozyten). Das Genprodukt Alpha-Aktinin-4 wird dabei besonders in den Podozyten, wo es die F-Aktinfilamente in den Fußfortsätzen vernetzt, reichlich vorgefunden.

Es hat sich gezeigt, dass durch die bei **FSGS1** auftretenden Mutationen die Affinität von Alpha-Aktinin-4 zu seinem Bindungspartner F-Aktinin massiv gesteigert ist. Dadurch ist die normale Anordnung der Aktinfilamente, sowie weiterer zytoskeletärer Komponenten innerhalb der Podozyten gestört.

Auf molekularer Basis konnte der zugrunde liegende Defekt der FSGS1 dem *ACTN4* Gen auf Chromosom 19q13 zugeordnet werden. **Sequenzanalysen** zeigten das Vorliegen von **Punktmutationen** (z.B. Nukleotid-Substitutionen in Position 682A>G; 703T>C; 695C>T). Diese Nukleotidsubstitutionen führen in weiterer Folge zu einer veränderten Aminosäuresequenz und sind als Missense-Mutationen zu klassifizieren.

Eine eingehende Analyse von Mutationen im *ACTN4* Gen wurde von Weins et al. im Jahr 2005 publiziert. Dabei wurden weitere Veränderungen in der Aminosäuresequenz gefunden, die sich in strukturellen Veränderungen der Peptidstruktur manifestierten. So führt die Substitution W59R zu einer massiv gesteigerten Affinität des veränderten Alpha-Aktinin 4 zu Aktin und zu einer ungewöhnlich raschen Progredienz der Erkrankung. In diesem Fall konnte sogar ein rezidivierendes Auftreten der Erkrankung im Nierentransplantat gezeigt werden. Die Ursache hierfür ist nicht geklärt.

Weitere Aminosäuresubstitutionen im Sinne von Punktmutationen waren: R310Q, Q348R, V801M, R837Q. Daneben konnte auch eine in frame-Deletion von drei Nukleotiden, die für Isoleucin an der 149. Stelle der Peptidkette kodieren, als Ursache der FSGS Typ 1 identifiziert werden (I149del). Auch hierbei zeigte sich die Aktinbindungskapazität des veränderten Alpha-Aktinins gesteigert.

In der folgenden Tabelle (**Tabelle 1**) soll eine kurze Übersicht über einige der oben genannten Mutationen gegeben werden. Es sei allerdings erwähnt, dass das Vorliegen von Punktmutationen nicht in jedem Fall zu einer veränderten

Aktinbindungskapazität führt. In **Abbildung 5** wird mittels Fluoreszenzfärbung gezeigt, dass bei einigen Punktmutationen im Vergleich zum Wild-Typ-Protein eine abnorme Konfiguration mit intrazellulären Agglutinaten auftreten, bei anderen hingegen kein signifikanter Unterschied in der sterischen Ausbreitung zu erkennen ist.

Table 1. Amino acid substitutions^a

Amino Acid Change	Nucleotide Change	SIFT	PolyPhen	Cellular Localization	Altered F-Actin Binding	Allele Frequencies in Controls	Co-Segregation with Phenotype in Pedigree	Disease Causing or Contributing
A6T	C16G	Tolerated	Benign	ND	ND	ND	No	No
W59R	C175T	Affects function	Probably damaging	Abnormal	Yes	0	Yes	Yes
I149del	del(445-447)	NA	NA	Abnormal	Yes	0	Yes	Yes
K255E ^b	A763G	Affects function	Benign	Abnormal	Yes	0	Yes	Yes
T259I ^b	C776T	Affects function	Possibly damaging	Abnormal	Yes	0	Yes	Yes
S262P ^b	T784C	Affects function	Possibly damaging	Abnormal	Yes	0	Yes	Yes
R310Q	G929A	Tolerated	Possibly damaging	Normal	No	0.0074 (8/1084) controls 0.016 (3/192) sporadic FSGS	No	Probably not
Q348R	A1046G	Affects function	Possibly damaging	Normal	No	0	NA	Probably not
A427T	C1292G	Tolerated	Benign	ND	ND	ND	No	No
V801M	G2401A	Affects function	Benign	Abnormal	No	0.005 (5/961)	Yes	Probably not
R837Q	G2511A	Affects function	Benign	Normal	No	0	No	Probably not

^aND, not done; NA, not available.

^bPreviously reported (1).

Tabelle 1. Übersicht über bisher identifizierte Mutationen im ACTN4 Gen (aus JASN 16: 3694-3701, 2005)

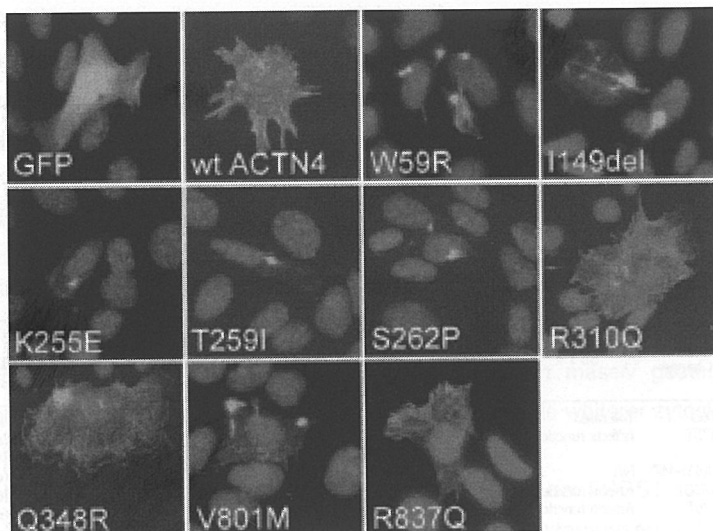


Abb. 5. Mit Fluoreszenzfärbung dargestellte intrazelluläre Konfiguration des alpha-Aktinin 4 bei den oben genannten Mutationen (aus J Am Soc Nephrol 16: 3694 – 3701, 2005)

Die FSGS1 kommt bei allen Rassen vor, obwohl vereinzelt über gehäuftes Auftreten bei Negriden berichtet wurde. Sie ist für etwa 3,5% der familiären Fälle von FSGS und für weniger als 1% der sporadischen Fälle von FSGS verantwortlich. Insgesamt sei angemerkt, dass ein Großteil der arbeitsdiagnostisch festgelegten Fälle von primärer FSGS nicht als Typ 1-3 klassifizierbar ist und somit durch andere hereditäre Nephropathien verursacht sind.

Bei der **FSGS2** ist die zu Grunde liegende Mutation im **TRPC6 Gen** lokalisiert, welches auf **Chromosom 11q21-q22** identifiziert wurde. Die Defekte im **TRPC6** Gen, welches für einen nicht selektiven Kationenkanal kodiert (TRCP6; transient receptor potential cationic channel 6), sind Missense-Mutationen, die zu einer veränderten Aminosäuresequenz führen. So konnte eine Punktmutation im Exon 2 des **TRCP6** Gens charakterisiert werden, die eine Veränderung des am Aufbau des Ionenkanals beteiligten Ankyrins führt (P112Q). Es sei noch erwähnt, dass TRCP6 zu einer

Kationenkanal-Superfamilie zählt, welche zu einer Erhöhung der interzellulären Kalziumkonzentration nach Aktivierung von G-Protein gekoppelten Rezeptoren und Rezeptor-Tyrosin-Kinasen führt. Man vermutet, dass die Mutationen am Rezeptor zur abnorm hohen interzellulären Kalziumkonzentrationen führt, wodurch die podozytäre Filterfunktion beeinträchtigt wird und in weiterer Folge der **Sklerosierungsprozess** angekurbelt wird.

Bei der **FSGS3**, bei der ein Gen-Defekt auf **Chromosom 6** zu finden ist, kommt es zu einer Veränderung des **CD2-assoziierten Proteins**. An dieser Stelle soll nicht weiter darauf eingegangen werden.

Die folgende Tabelle (**Tabelle 2**) soll als Abschluss der allgemeinen Einführung einen Überblick über bekannte hereditäre Nierenerkrankungen darstellen, die mit dem klinischen Phänotyp einer FSGS assoziiert sind.

Disease*	Mode of Inheritance†	Locus and Gene	Protein	Mechanism	Clinical Description and Comments
Congenital nephrotic syndrome of the Finnish type (CNF, or NPHS1; OMIM no. 256300)	AR	19q13.1, <i>NPHS1</i>	Nephrin	Mutations in the slit-diaphragm protein nephrin, leading to malfunction or absence of the slit diaphragm	Usually massive proteinuria in utero, with onset of nephrotic syndrome within the first weeks of life; placenta weight more than 25% of birth weight; kidney transplantation only curative therapy; milder proteinuria phenotype sometimes observed; resistant to corticosteroid and cyclophosphamide therapy; genetic test commercially available
Corticosteroid-resistant nephrotic syndrome (SRNS, or NPHS2; OMIM no. 604766)	AR	1q25-31, <i>NPHS2</i>	Podocin	Mutations in the slit-diaphragm protein podocin, leading to malfunction or absence of the slit diaphragm	Onset and severity of nephropathy varying from early-onset nephrosis to mild proteinuria starting in early adulthood; resistance to immunosuppressive corticosteroid therapy; early minimal changes, and focal segmental glomerulosclerosis in later stages; genetic test commercially available
Pierson's syndrome (OMIM no. 150325)	AR	3p21, <i>LAMB2</i>	Laminin $\beta 2$ chain	Mutations in the adult glomerular basement membrane laminin-11 isoform, leading to abnormalities of podocyte and slit-diaphragm development and function; mechanism leading to nephropathy not completely understood	Onset of nephrosis soon after birth; development of diffuse mesangial sclerosis and microcornea (fixed narrowing of the pupil)
Nail-patella syndrome (OMIM no. 161200)	AD	9q34.1, <i>LMX1B</i>	LMX1B	Mutations in the LMX1B transcription factor, which regulates podocyte genes encoding nephrin, podocin, and CD2-associated protein, as well as COL4A3 and COL4A3 type IV collagen	Variable penetrance; nephrotic syndrome as well as skeletal and nail dysplasias in children
Denys-Drash syndrome (OMIM no. 154080) and Frasier's syndrome (OMIM no. 136680)	AD	11p13, <i>WT1</i>	WT1	Mutations in the WT1 transcription factor, which regulates a number of podocyte genes; mechanism leading to nephropathy not completely understood	Male pseudohermaphroditism combined with progressive glomerulopathy, early onset of nephropathy, and end-stage renal disease by 3 years of age in Denys-Drash syndrome; later onset of nephropathy in Frasier's syndrome, with development of focal segmental glomerulosclerosis; resistant to any treatment except kidney transplantation
Focal segmental glomerulosclerosis (FSGS1; OMIM no. 603278)	AD	19q13, <i>ACTN4</i>	α -Actinin-4	Mutations in actin filament-cross-linking α -actinin-4, leading to abnormalities in podocytes, probably by dysregulation of the foot-process cytoskeleton	Mild proteinuria in adolescence or early adulthood; slow progression to focal segmental sclerosis and end-stage renal disease in adulthood
Focal segmental glomerulosclerosis (FSGS2; OMIM no. 603965)	AD	11q21-22, <i>TRPC6</i>	TRPC6	Mutations in TRPC6, a calcium-permeable cation channel, leading to abnormal podocyte function; mechanism leading to nephropathy not completely understood	Proteinuria in adolescence or early adulthood; progression to focal segmental glomerulosclerosis and end-stage renal disease in adulthood

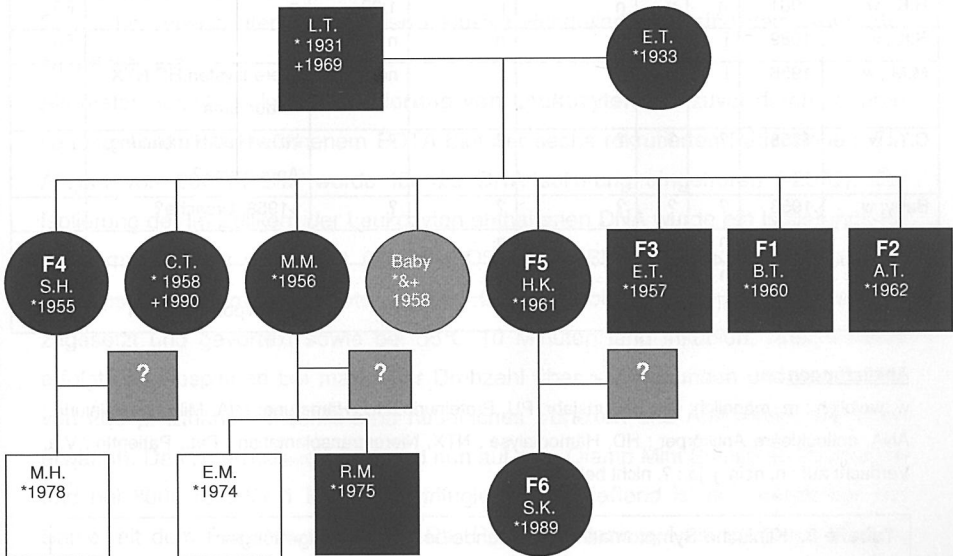
Tabelle 2. Übersicht über hereditäre Nierenerkrankungen, die mit dem klinischen Phänotyp einer fokal segmentalen Glomerulosklerose assoziiert sind.
(aus New England Journal of Medicine 354; 1387-1401, 2006)

PatientInnen und Methoden

PatientInnen


Im Rahmen einer Routineuntersuchung wurde bei einem beschwerdefreien Patienten eine **Proteinurie** diagnostiziert, weshalb der Patient zur weiterführenden Abklärung an die nephrologische Ambulanz des Wiener AKH zugewiesen wurde. Nach Ausschluss sekundärer Ursachen wurde die Verdachtsdiagnose primäre FSGS gestellt. Aufgrund der genetischen Grundlagen galt es nun herauszufinden, ob in der Familie des Patienten weitere Erkrankungsfälle vorliegen. Diesbezüglich wurde ein **Familiencreening** hinsichtlich pathologischer Nierenfunktionsparameter durchgeführt. Bei fünf weiteren Familienmitgliedern fand sich eine zum Teil erhebliche Beeinträchtigung der renalen Funktion bis hin zur Dialysepflichtigkeit. Um einen Überblick über die genetischen Hintergründe und die Verwandtschaftsverhältnisse der PatientInnen zu gewinnen, wurde ein Stammbaum angefertigt.

Skizze 1: Stammbaum der Familie mit Verdacht auf primäre FSGS



Legende:

F1-F6: untersuchte Patienten

männlicher Patient: symptomatisch: asymptomatisch: unklar: weiblicher Patient: symptomatisch: asymptomatisch: unklar: 

Die Angaben beinhalten Patientenzuordnung (F1-F6), Geburtsdatum und Initialen der Namen. Im Anschluss sind die pathologischen Befunde der PatientInnen, tabellarisch aufgeführt:

Name, Geschlecht	GJ	PU	HU	MIA im Harn	CreaClear reduziert	ANA- Titer	HD/NTX/Tod Pathologie	Pat.Nr
L.T.; w	1931	?	?	?	?	?	Schrumpfnieren;Urämie + 1969	
E.T.; m	1933	j	n	j	j	1:80	aHT	
B.T.; m	1960	j	n	j	j	1:160	n	F1
A.T.; m	1962	j	j	j	j	1:160	HD; 2x NTX; aHT	F2
E.T.; m	1957	n	n	n	j	1:80	n	F3
S.H.; w	1955	j	n	j	j	neg	n	F4
H.K.; w	1961	n	n	n	j	1:80	n	F5
S.K.; w	1989	j	n	n	n	neg	n	F6
M.M.; w	1956	j	n	j	j	neg	Nierenzysten,HD,NTX, Aneurysma	
C.T.; w	1958	?	?	?	?	?	HD;+1990 Hirnblutung, Aneurysma?	
Baby; w	1958	?	?	?	?	?	+1958, Ursache?	
M.H.; m	1978	n	n	n	n	n	n	
E.M.; m	1974	n	n	n	n	n	n	
R.M.; m	1975	j	j	n	n	n	V.a. Alport-Syndrom	

Abkürzungen :

w, weiblich ; m, männlich; GJ, Geburtsjahr; PU, Proteinurie; HU, Hämaturie; MIA, Mikroalbuminurie ;
ANA, antinukleäre Antikörper ; HD, Hämodialyse ; NTX, Nierentransplantation ; Pat., PatientIn ; V.a.
Verdacht auf ; n, nein, j, ja ; ?, nicht bekannt.

Tabelle 3. Klinische Symptomatik und Befunde bei Familienangehörigen

Mutationssuche in den Exons des *ACTN4* Gens

In der vorliegenden Arbeit sollte abgeklärt werden, ob sich innerhalb des *ACTN4* Gens eine krankheitskausale Mutation befindet, also eine FSGS vom Typ 1 vorliegt. Diese Fragestellung implizierte die Etablierung einer entsprechenden Sequenzanalyse für unsere ProbandInnen. Um eine **Mutationsanalyse** mittels Sequenzierung durchzuführen, sind generell die folgenden Schritte und Verfahren notwendig:

- **Isolierung von Nukleinsäuren** (DNA oder RNA aus Vollblut oder Leukozyten) der ProbandInnen
- **PCR** zur Amplifikation des zu sequenzierenden Gens, in dem die Mutation(en) vermutet werden. Dafür sind mehrere **spezifische Primerpaare** notwendig
- Nach Etablierung der PCR-Systeme, **Reinigung der PCR Produkte**
- **Sequenzreaktion**
- **Reinigung** der sequenzierten PCR-Produkte
- **Elektrophoretische Trennung**
- **Sequenzanalyse** durch **Vergleich** der Basensequenz der ProbandInnen mit einer Referenzsequenz ohne Mutation (= Wild-Typ Sequenz)

Sämtliche verwendeten Reagenzien inklusive Herstellerfirmen sind dem **Appendix** zu entnehmen.

Als erster Schritt erfolgte die **Isolierung von Leukozyten** aus zuvor durch peripher venöse Abnahme gewonnenem EDTA-Blut der sechs rekrutierten PatientInnen. Ein Aliquot von 200 µl Blut wurde für die DNA-Isolierung eingefroren (-20°C). Zur Isolierung der im Zellkern der Leukozyten enthaltenen DNA wurde ein Isolierungs-Kit der Firma Qiagen verwendet (QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit). Dazu werden zunächst zu 20 µl gelöster Protease (QP) 200 µl Vollblut und 200 µl Lysepuffer (AL) zugesetzt und gevortext sowie bei 56°C 10 Minuten lang inkubiert. Anschließend erfolgt das Abspinnen bei maximaler Drehzahl über > 5 Sekunden und der Zusatz von 200 µl Ethanol (anschließend neuerliches Vortexen und Abspinnen, wie oben erwähnt). Das so erhaltene Lysat wird nun auf eine Qiamp Mini Spinsäule übertragen und bei 8000 rpm für 1 Minute zentrifugiert. Anschließend ist der untere Teil der Säule mit dem Filtrat zu verwerfen. Der Rest wird dann auf ein sauberes Wasch-Tube (WT) gesetzt und nach dem Öffnen des Deckels der Säule 500 µl Waschpuffer

1 (AW1) zugesetzt, wobei Rand und Membran der Säule nicht benetzt werden dürfen. In weiterer Folge wird bei 8000 rpm für 1 Minute zentrifugiert und das Filtrat verworfen. Nach Verwenden eines neuen sauberen WT wird das obige Procedere mit dem Waschpuffer 2 (AW2) wiederholt, die Säule auf ein Elutions-Tube gesetzt und 100 µl Elutionspuffer (AE) auf die Membranmitte pipettiert. Nun ist es wichtig, bei Raumtemperatur für 1 Minute zu inkubieren, ehe neuerlich bei 8000 rpm für 1 Minute zentrifugiert wird. Abschließend wird die DNA für etwa 5 Minuten bei Raumtemperatur im Elutionspuffer gelöst. Wichtig ist, dass die DNA nach diesen Isolierungsschritten bei -20°C eingefroren wird, um ein Degradieren zu verhindern. Die so gewonnene DNA konnte nunmehr als Ausgangsmaterial für eine PCR-Amplifikation verwendet werden. Für drei weitere PCR-Systeme war RNA das Ausgangsmaterial. Zu diesem Zweck wurde nach Vorbereitung des Arbeitsplatzes mittels RNase Erade Spray mit der **Extraktion der Gesamt-RNA** aus Leukozyten begonnen. Als erster Schritt wurde zu 1×10^7 Leukozyten in 1,8 ml RNazol vorgekühltes Chloroform (180 µl) zugesetzt. Nach kurzem Vortexen auf dem Kryoblock für 5 Minuten belassen, ehe eine Zentrifugation für 15 Minuten bei 4°C und 12.000 rpm erfolgte. Nun war es wichtig, von der oberen, wässrigen Phase, in der die RNA enthalten ist, 800 – 900 µl abzuheben und die gleiche Menge (vorgekühlten) Isopropanol beizugeben.

Anschließend erfolgte die RNA-Präzipitation bei -20°C für 20 Minuten und die Zentrifugation bei 4 °C für 15 Minuten und 12.000 rpm, worauf hin neuerlich der Überstand abgehoben wurde und das so erhaltene Pellet mit 800 µl eiskaltem 75%igem Ethanol gewaschen und gevortext wurde. Anschließend wurde neuerlich wie oben beschrieben, zentrifugiert, der Alkohol so gut wie möglich abpipettiert und das gereinigte Pellet bei Raumtemperatur 1 Minute lang getrocknet, ehe es in 35 µl DEPC-behandeltem Aqua bidest. resuspendiert und nach wiederholtem Vortexen und Abspinnen auf dem Thermoblock bei 95°C gelöst wurde.

Wie schon in der Einleitung erwähnt, werden drei verschiedene Formen der FSGS unterschieden. In der vorliegenden Arbeit wurde eine Mutationsanalyse bei Verdacht auf FSGS Typ 1 im *ACTN4* Gen durchgeführt. Das *ACTN4* Gen weist insgesamt 21 Exons auf (**Tabelle 4**) und erstreckt sich mit allen kodierenden und nicht kodierenden Sequenzen über mehr als 81.88 Kilobasen (mRNA: 2925 bp; kodierende Region: 2736 bp).

Tabelle 4. Lage der Exons im ACTN4 Gen (Nukleotidpositionen nach GenBank Acc. nm004924)

Exon 1:	Exon 12 :
1..221	1351..1501
Exon 2:	Exon 13 :
222..336	1502..1610
Exon 3:	Exon 14 :
337..456	1611..1751
Exon 4:	Exon 15 :
457..543	1752..1934
Exon 5:	Exon 16 :
544..631	1935..2069
Exon 6:	Exon 17 :
632..710	2070..2249
Exon 7:	Exon 18 :
711..792	2250..2396
Exon 8:	Exon 19 :
793..878	2397..2477
Exon9 :	Exon 20 :
879..971	2478..2636
Exon 10 :	Exon 21 :
972..1202	2637..3893
Exon 11 :	
1203..1350	

Die **Abbildung 6** zeigt die **Lokalisation des ACTN4 Gens auf Chromosom 19** (Chromosom 19q13).

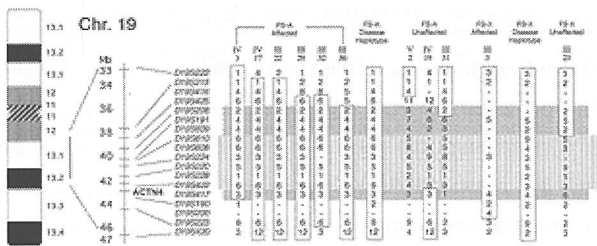


Abb. 6. Lokalisation des ACTN4 Gens auf Chromosom 19

In der **Abbildung 7** ist die Aminosäuresequenz des **alpha-Aktinin-4 Proteins** dargestellt. Insgesamt sind 911 Aminosäuren am Aufbau beteiligt.

10	20	30	40	50	60
MVDYHAANQS	YQYGPSSAGN	GAGGGGSMGD	YMAQEDDWDR	DLLLDPAWEK	QQRKFTTAWC
70	80	90	100	110	120
NSHLRKAGTQ	IENIDEDFRD	GLKLMLLLEV	ISGERLPKPE	RGKMRVHKIN	NVNKALDFIA
30	140	150	160	170	180
SKGVKLVSIG	AEEIVDGNAG	MTLGMIWTII	LRFAIQDISV	EETSAKEGLL	LWCQRKTAPY
190	200	210	220	230	240
KNVNVQNFHI	SWKDGLAFNA	LIHRHRPELI	EYDKLRKDDP	VITNLNNAFEV	AEKYLDIPKM
250	260	270	280	290	300
LDAEDIVNTA	RPDEKAIMTY	VSSFYHAFSG	AQKAETAANR	ICKVLAVNQE	NEHLMEDYEK
310	320	330	340	350	360
LASDLLEWIR	RTIPWLEDRV	PQKTIQEMQQ	KLEDFRDYRR	VHKPPKVQEK	CQLEINFNTL
370	380	390	400	410	420
QTKLRLSNRP	AFMPSEGMV	SDINNGWQHL	EQAEKGYEEW	LLNEIRRLER	LDHLAEKFRQ
430	440	450	460	470	480
KASIHEAWTD	GKEAMLKHRD	YETATLSDIK	ALIRKHEAFE	SDLAHQDRV	EQIAAIAQEL
490	500	510	520	530	540
NELDYDSDHN	VNTRCQKICD	QWDALGSLTH	SRREALEKTE	KQLEAIDQLH	LEYAKRAAPF
550	560	570	580	590	600
NNWMESAMED	LQDMFIVHTI	EEIEGLISAH	DQFKSTLPDA	DREREAIALI	HKEAQRIAES
610	620	630	640	650	660
NHIKLSGNSP	YTTVTPQIIN	SKWEKVQQLV	PKRDHALLEE	QSKQQSNEHL	RRQFASQANV
670	680	690	700	710	720
VGPWIQTKME	EIGRISIEMN	GTLEDQLSHL	KQYERSIVDY	KPNLDLLEQQ	HQLIQEALIF
730	740	750	760	770	780
DNKHNTYIME	HIRVGWEQLL	TTIARTINEV	ENQILTRDAK	GISQEQMQEF	RASFNFHFKD
790	800	810	820	830	840
HGGALGPEEF	KACLISLGYD	VENDRQGEAE	FNRIMSLVDP	NHSGLVTFQA	FIDFMSRETT
850	860	870	880	890	900
DTDTADQVIA	SFKVLAGDKN	FITAEELRRE	LPPDQAEYCI	ARMAPYQGPD	AVPGALDYKS
910					
FSTALYGESD	L				

Abb. 7. Aminosäuresequenz des alpha-Aktinin-4-Proteins

In **Tabelle 5** sind die Aminosäuren und deren internationale Kurzbezeichnungen zusammengefasst. Der Ein-Buchstaben-Kode wird für die Darstellung von Proteinsequenzen verwendet. Für die Bezeichnung von Mutationen wird von der Deutschen Gesellschaft für Humangenetik empfohlen, den Drei-Buchstaben-Kode zu verwenden, um eine eindeutige Zuordnung der Mutationen zu Nukleotidposition oder Aminosäurenposition zu ermöglichen (Doppelbedeutung einzelner Buchstaben, wie z.B. A für Adenin bei der Beschreibung der Purin- und Pyrimidinbasen bedeutet zugleich Alanin im Aminosäurekode).

Aminosäure und Kurzform	Aminosäure und Kurzform
Asparaginsäure: D; Asp	Arginin: R; Arg
Glutaminsäure: E; Glu	Histidin: H; His
Tyrosin: Y; Tyr	Tryptophan: W; Trp
Asparagin: N; Asn	Glycin: G; Gly
Glutamin: Q; Gln	Alanin: A; Ala
Threonin: T; Thr	Phenylalanin: F; Phe
Serin: S; Ser	Prolin: P; Pro
Cystein: C; Cys	Methionin: M; Met
Lysin: K; Lys	Valin: V; Val
Isoleucin: I; Ile	Leucin: L; Leu

Tabelle 5. Aminosäuren und die international gebräuchlichen Kurzformen

Polymerase-Ketten Reaktion (PCR)

Um eine Sequenzanalyse durchführen zu können, ist es notwendig, mittels PCR die zu untersuchenden Genabschnitte zu amplifizieren, um in weiterer Folge genügend Material für eine detaillierte Sequenzierung der Basen zu erhalten.

Das allgemeine Prinzip der **PCR** beruht auf der enzymatischen Amplifikation eines durch gezielte Primerauswahl festgelegten DNA-Abschnittes. Im Rahmen der heute in so genannten PCR-Cyclern automatisiert ablaufenden Reaktion ist es möglich, in kurzer Zeit aus wenig DNA-Ausgangsmaterial eine enorme Menge von Kopien an DNA-Abschnitten zu erzeugen und diese molekularbiologisch zu analysieren. Im Wesentlichen besteht der Zyklus aus den Schritten **Denaturierung** (durch Erhöhung der Temperatur weichen die beiden komplementären DNA-Stränge auseinander), **Annealing** (Anlagerung der Primer) und **Synthese** (Verknüpfung der Nukleotide

durch die hitzestabile Polymerase und Synthese eines der Vorlage komplementären Stranges).

Dabei ist zu beachten, dass neben einer von einem Standardprotokoll ausgehenden Mischung der notwendigen Komponenten (PCR Master Mix, siehe unten) die Programmierung des Cyclers für den Erfolg der Amplifikation von entscheidender Bedeutung ist. Eingegeben werden die Temperaturen sowie die zeitliche Dauer der einzelnen Teilschritte und die Anzahl der Zyklen. Das unten abgebildete Schema soll das allgemeine Prinzip der PCR veranschaulichen:

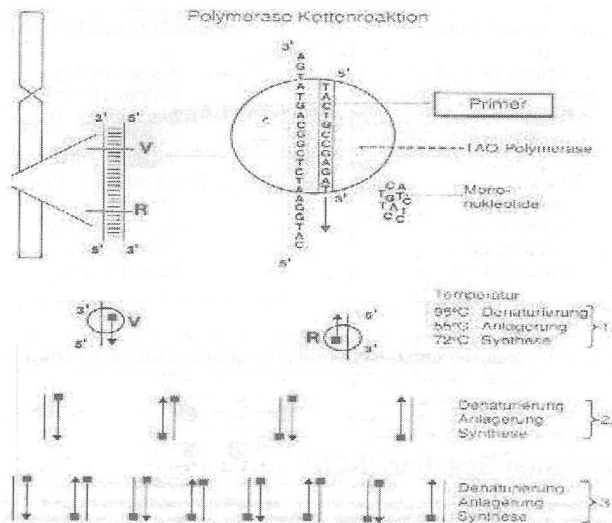


Abb. 8: zyklischer Ablauf der Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Um alle Exons des *ACTN4* Gens amplifizieren zu können, wurden zunächst 4 überlappende Primersysteme verwendet (jeweils ein **forward-** und ein **reverse-Primer**, die sich hinsichtlich ihrer Leserichtung an der DNA-Matrize unterscheiden) welche die gesamte kodierende Sequenz (cDNA) des *ACTN4* Gens umfassten (Primersystem 1/2, 3/4, 5/6). Exon 8 wurde mit dem Primersystem 7/8 analysiert, wobei DNA als Ausgangsmaterial diente.

Die folgenden **Tabellen 6** und **7** geben einen Überblick über die verwendeten Primersysteme und die Länge der PCR-Produkte sowie die Nukleotidsequenzen der einzelnen Primer:

Primersysteme	Länge des PCR-Produktes
FSGS1/FSGS2 (<i>cDNA</i>)	680 bp
FSGS3/FSGS4 (<i>cDNA</i>)	1040 bp
FSGS5/FSGS6 (<i>cDNA</i>)	1100 bp
FSGS7/FSGS8 (<i>DNA</i>)	328 bp

Tabelle 6. verwendete Primerpaare und die Länge ihres PCR-Produktes

Primer	Nukleotid-Position	Sequenz (5'-3')	Ausgangsmaterial
FSGS1	81835	GGAGGACTGCAGAGAGTGCTTTGC	cDNA
FSGS2	78155	CAGCACCAGCTCATCCAGGAGGC	
FSGS3	69535	GAAGTGCCAGCTGGAGATCAACTTC	
FSGS4	78187	GTATAGTTGGTGTGCTTGTTGTCG	cDNA
FSGS5	74	CGCGGCGAACCAGTCGTACCAG	
FSGS6	69564	GAGGCGCAGCTTGGTCTGCAGC	gDNA
FSGS7	3361	CCCAAGTCACGCGTCACTCTGC	
FSGS8	3689	GAGAGAGGCCACTGCCGTCTGC	

Tabelle 7. Nukleotidsequenzen und Nukleotidpositionen der eingesetzten Primer
(Nat. Genet. 24: 251 – 256, 2000; GenBank Accession NG_007082.1)

Primersystem	Exons
FSGS 5/ FSGS 6	1 – 10
FSGS 3/ FSGS 4	11 – 17
FSGS 1/ FSGS 2	17 – 21
FSGS 7/ FSGS 8	8

Tabelle 8. Primersysteme, mit denen die 21 Exons des *ACTN4* Gens amplifiziert wurden

Zur **Herstellung der cDNA** wurde nach einem Standardprotokoll vorgegangen. Dazu wurde zunächst ein Mastermix für die reverse Transkription angesetzt:

Mastermix	1 x MM	5 x MM	110 x MM
5 x First-Strand Buffer	4 µl	20 µl	440 µl
DTT, 100 mM (=0,1M)	2 µl	10 µl	220 µl
dNTP Mix, 100 mmol	0.8 µl	4 µl	88 µl
Random Hexamere, 100 pM / µl	1 µl	5 µl	110 µl
BSA, 1 mg / ml	2 µl	10 µl	220 µl
RNA Guard (20,0 – 35,8 U / µl)	1 µl	5 µl	110 µl
	10,8 µl	54 µl	1188 µl
M-MLV Reverse Transcriptase	1 µl	5 µl	110 µl
	11,8 µl	59 µl	1298 µl

Zur **Denaturierung der RNA** vor dem Einsatz in die cDNA-Synthese musste die tiefgefrorene RNA aufgetaut und gevortext werden, ehe durch Erhitzen auf 70°C für 10 Minuten die eigentliche Denaturierung stattfinden konnte.

In weiterer Folge wurde nach Vorheizen des Thermoblocks auf 37°C 5 µl **reverse Transkriptase** (M-MLV Reverse Transcriptase) dem Mastermix zugesetzt. Wichtig ist zu erwähnen, dass das Enzym erst unmittelbar vor der Verwendung aus dem Kühler genommen werden darf und nach Gebrauch auch sofort wieder dorthin zurückgestellt werden soll, um eine vorzeitige Enzymaktivierung bzw. spätere Inaktivierung zu verhindern (Lagerung bei -20°C). Nach kurzem Vortexen und Abspinnen wurde das Mastermix-Enzymgemisch dem Protokoll folgend in frische Stempelhütchen pipettiert und exakt 8,2 µl Gesamt-RNA (1 µg) zugemengt und vorsichtig gemischt. Nun wurde auf dem vorgeheizten Thermoblock bei 37°C für 60 Minuten und dann bei 95°C für 5 Minuten inkubiert. Anschließend wurde zu den 20 µl cDNA 80 µl fertiger 1 x Tris-EDTA-Puffer zugegeben und die RT-PCR gestartet. Für den Fall, dass eine RT-PCR nicht unmittelbar im Anschluss stattfinden kann, kann der Mastermix (ohne Enzym) bei -20°C oder -80°C eingefroren werden.

Der **Vorteil** der reversen Transkription von RNA in cDNA besteht darin, Exons ohne Introns zu amplifizieren, sodass in einem PCR-Produkt mehrere Exons auf Mutationen untersucht werden können. Alleine dadurch wurde es erst möglich, mit

insgesamt 4 Primerpaaren das gesamte *ACTN4* Gen abzudecken. Würde man für die Mutationsanalyse DNA als Ausgangsmaterial verwenden, wäre eine sehr viel höhere Anzahl an Primerpaaren notwendig. Ein **Nachteil** der cDNA-basierenden Sequenzanalyse besteht jedoch darin, dass die Menge an PCR-Produkt für die Sequenzierung von der Expression der Gene abhängig ist.

Die nächste Aufgabe bestand nun darin, Protokolle für die PCR Amplifikation zu etablieren. Dazu wurde DNA oder cDNA der 6 Familienangehörigen (F1-F6) nach einem Standardprotokoll pipettiert (PCR-Mastermix) und die enzymatische Amplifikation automatisiert (PCR-Cycler PTC 200, MJ Research) durchgeführt.

Tabelle 9. PCR Reaktionen

PCR System	FSGS1/2	FSGS3/4	FSGS5/6	FSGS7/8
Mastermix	1x	1x	1x	1x
10x Puffer II	2,5 µl	2,5 µl	2,5 µl	2,5 µl
25 mM MgCl ₂	1,5 µl	1,5 µl	1,5 µl	1,5 µl
dNTP Mix	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl
FSGS Primer F (10 pmol/µl)	2,5 µl	2,5 µl	2,5 µl	2,5 µl
FSGS Primer R (10 pmol/µl)	2,5 µl	2,5 µl	2,5 µl	2,5 µl
HF Enzym (3,5 U/µl)	0,2 µl	0,2 µl	0,2 µl	0,2 µl
Wasser	12,8 µl	12,8 µl	12,8 µl	12,8 µl
total	24 µl	24 µl	24 µl	24 µl
cDNA/DNA	1 µl cDNA	1 µl cDNA	1 µl cDNA	1 µl DNA

F, „forward“; R, „reverse“; HF-Enzym, high fidelity enzyme, Firma Roche

Tabelle 10. Bedingungen für die PCR Amplifikation

Schritt	FSGS 1/2	FSGS 3/4	FSGS 5/6	FSGS 7/8	Zeit
Denaturieren	94	94	94	94	2 min
Denaturieren	94	94	94	94	15 sec
Annealing	55	55	55	66	30 sec für FSGS 7/8
					1 min für FSGS 1/2, 3/4, 5/6
Extension	72	72	72	72	45 sec für FSGS 7/8, 1min 30 sec für FSGS 1/2, 3/4, 5/6
Finale Extension	72	72	72	72	7 min
Finale	4	4	4	4	unendlich
Zyklen	50	50	50	35	

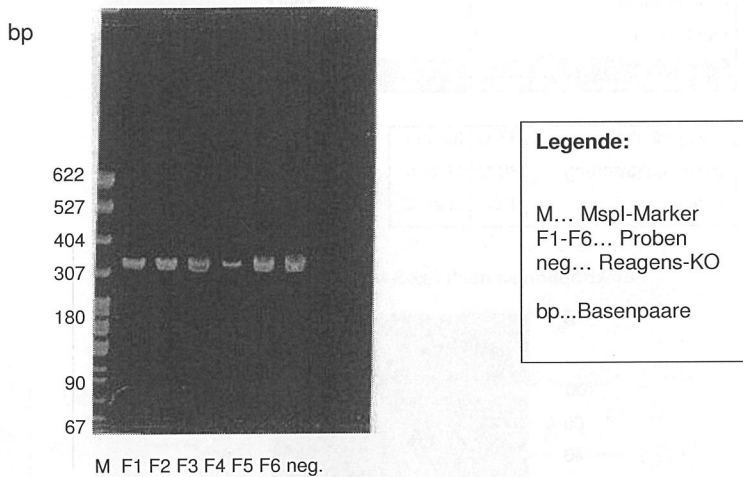
Um die Spezifität der PCR Produkte zu verifizieren, wurden die Amplifikate elektrophoretisch aufgetrennt. Die **Gelelektrophorese** (6% Polyacrylamid Gele) wurde in einem eigenen Arbeitsraum durchgeführt: zunächst musste die Elektrophoresewanne mit 1xTBE Puffer (Fa. Sigma) befüllt werden und die fertig abgepackten Gele in die Haltevorrichtungen eingeführt werden. Insgesamt wurden zwei 6% Polyacrylamid-Gele eingespannt und die Vertiefungen (pro Gel n=15) mit je 2 µl PCR-Produkt der sechs Proben und einer Negativkontrolle beladen. Die letzte freie Bahn wurde für das Mitlaufen eines **Längen-Markers** (pBR 522/Mspl, New England Biolabs) verwendet, der als Orientierungshilfe zur Beurteilung der Banden hinsichtlich Fragmentlänge benötigt wurde.

Nach dem Beladen wurde die Elektrophorese bei 150 Volt für etwa 45 Minuten durchgeführt. Anschließend wurde die Elektrophoresevorrichtung zerlegt und die Gele in einem weiteren Arbeitsraum für 15 Minuten in eine Wanne mit Fluoreszenzfarbstoff (**Sybr-Green**) eingelegt, um sie anschließend auf einem Fotoblock unter UV-Licht zu fotografieren. Das UV-Licht regt dabei den durch den Färbeporgang in die DNA der Banden interkalierten Farbstoff zur Fluoreszenz an,

sodass die Banden deutlich sichtbar gemacht und abgebildet werden können. Dabei ist es wichtig, dass keine Luftblasen unter dem Gel vorhanden sind, die den Dokumentationserfolg beeinträchtigen würden. Zudem darf naturgemäß kein Licht während des Fotografierens auf den Film fallen.

Der entscheidende Vorteil des verwendeten Farbstoffes gegenüber dem ebenfalls in die DNA interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffes Ethidiumbromid besteht in der einfachen, unkomplizierten Handhabung und dass diese im Gegensatz zu Ethidiumbromid nicht toxisch ist.

Nach dem Entwickeln der Fotos kann das Bandenmuster hinsichtlich Qualität und Quantität beurteilt werden.



Gelkontrolle mit 2 µl PCR-Produkt + 1 µl 5 x Loading Buffer, 6% Polyacrylamidgel, 150 Volt; Färben in 1 x SybrGreen für 15 Minuten, PCR-Fragmentgröße: 328 bp (dargestellt ist Primersystem FSGS7/8)

Im Laufe der PCR-Etablierungsarbeiten zeigte sich, dass die mit cDNA arbeitenden PCR-Systeme keine oder nur geringe Bandenintensitäten lieferten. Da sich auch nach Modifikation des Protokolls keine signifikante Verbesserung ergab, musste davon ausgegangen werden, dass die cDNAs der PatientInnen im Zuge der längeren Lagerung degeneriert war, weshalb neue cDNAs generiert wurden.

Mit dem auf DNA basierenden Primer-System 7/8 zeigte sich, wie in der Gelkontrolle ersichtlich, ein zufriedenstellendes Amplifikationsergebnis, sodass eine Sequenzanalyse durchgeführt werden konnte. Nach der PCR-Amplifikation wurde das PCR-Produkt für die Sequenzanalyse gereinigt. Dies erfolgte in der vorliegenden Arbeit enzymatisch unter Verwendung von Exonuklease (Exo) und Shrimps-alkalischer Phosphatase (SAP).

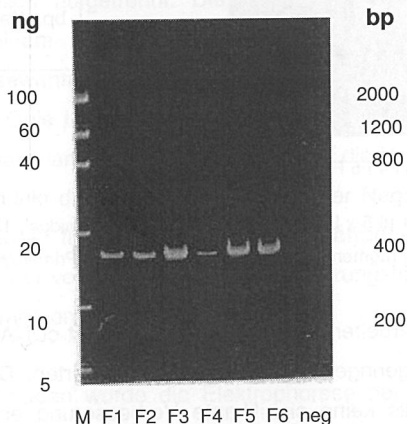
Tabelle 11. Enzymatische Reinigung der PCR Produkte

Proben: F1-F6, PCR FSGS 7/8

Volumen	
PCR Produkt	10µl
Exo SAP-IT	4µl
Gesamtvolumen	14µl

Enzyminkubation	37°C	30 min
Enzyminaktivierung	80°C	15 min
Finale	4°C	unendl.

Elektrophorese nach ExoSAP-Verdau von PCR FSGS 7/8



Legende:

M... Marker
F1-F6...Proben
neg...Reagens-KO

ng...Nanogramm
bp...Basenpaare

Gelkontrolle mit 2 µl PCR-Produkt + 1 µl 5 x Loading Buffer, 6% Polyacrylamidgel, 150 Volt; Färben in 1 x SybrGreen für 15 Minuten

Nukleotidsequenzanalyse

Die Nukleotidsequenzanalyse wurde automatisiert mittels Kapillarelektrophorese durchgeführt. Das allgemeine Prinzip der Sequenzanalyse mittels Kapillarelektrophorese sei im Folgenden kurz erläutert: nach einer Sequenzreaktion, bei der fluoreszenzmarkierte Nukleotide eingebaut werden, werden die Syntheseprodukte am Ende ihrer Wanderung im elektrischen Feld (Polyacrylamid-Gel) von geeigneten Laserstrahlen zur Fluoreszenz angeregt, von einer „charge-coupled“ Kamera detektiert und mit einer speziellen Software in die entsprechenden Nukleotide (A, C, G, T) übersetzt.

Die folgende Abbildung soll vereinfacht das technische Prinzip der Sequenzierung veranschaulichen:

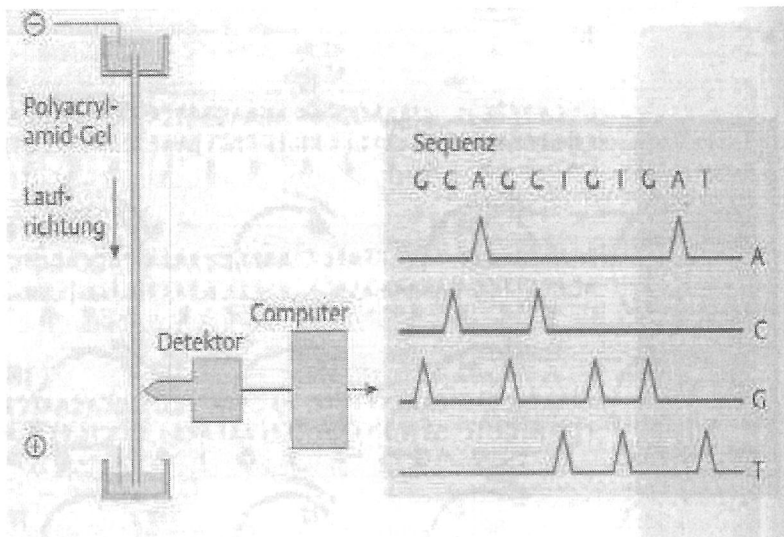


Abb. 9. technisches Prinzip der modernen automatisierten Sequenzanalyse mittels Kapillarelektrophorese

Je nach Herstellerfirma können zwei grundlegende Varianten der Automatisierung unterschieden werden. Einerseits ist es möglich vier separate Elektrophoresebahnen zu verwenden (jeweils einen Farbstoffes für die Basen A, T, G, C pro Bahn), andererseits besteht die Möglichkeit, mit nur einer Elektrophoresebahn zu arbeiten, wobei die vier eingesetzten Nukleotide jeweils einen anderen Fluoreszenzfarbstoff tragen. Durch Verwendung von Gel gefüllten Kapillaren, wie sie auch in der vorliegenden Arbeit verwendet wurden, ist es möglich bei der automatischen Sequenzierung eine enorme Anzahl von Sequenzreaktionen gleichzeitig durchzuführen (n=16 Kapillaren beim ABI 3130xl). Eine Software erlaubt die Zuordnung der Basen zu jeder einzelnen Position innerhalb des analysierten DNA-Abschnittes. Die **Abbildung 10** zeigt das Resultat einer automatisierten Sequenzanalyse.

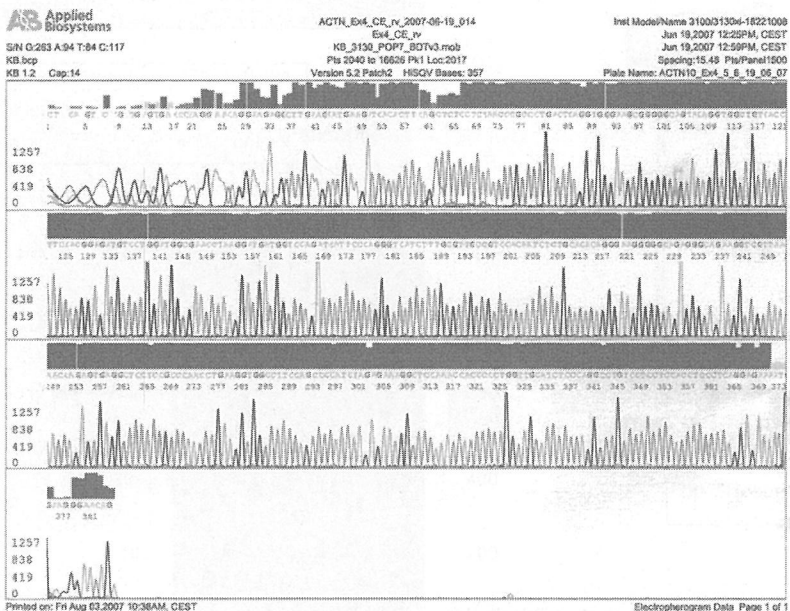


Abb. 10. exemplarischer Befund einer automatisierten Sequenzanalyse
(Ausdruck nach Analyse am 3130xl Sequencer, Firma ABI)

Die Sequenzanalysen in der vorliegenden Arbeit wurden nach den folgenden Protokollen durchgeführt:

Tabelle 12. Sequenzreaktion

Mastermix	1x
RRM (1,6 µl MagicDye + 0,4 µl BigDye)	2 µl
FSGS fw + rv Primer (1,6 pmol/ µl)	2 µl
5 x Sequenzier Puffer	1,5 µl
HPLC Wasser	2,5 µl
PCR Produkte (1.5 – 5 ng/mL) unverdünnt oder 1:2 verdünnt	2 µl
Gesamtvolumen	10 µl

Die in der Sequenzreaktion eingesetzte Menge an PCR-Produkt war abhängig von der Bandenintensität. Bei schwächeren Banden wurden 4 µl in die Reaktion eingesetzt und nur 0.5 µl HPLC Wasser verwendet.

Tabelle 13. Bedingungen für Sequenzreaktion mittels PCR

Sequenzierprimer	FSGS1, 2, 3, 4		FSGS 5, 6, 7, 8	
Schritt	Temp. (°C)	Zeit	Temp. (°C)	Zeit
Denaturieren/Aktivieren	96	1 min	96	1 min
Amplifikation (25 Zyklen)	96	10 sec	96	10 sec
	51	5 sec	51	5 sec
	60	4 min	60	4 min
Finale	4	unendlich	4	unendlich

Nach der Sequenzreaktion wurden die Sequenzierprodukte mit **Millipore-Filtrationsplatten** gereinigt. Diese Platten sind Filtrationsplatten für den einmaligen Gebrauch.

Mittels **Vakuumfiltration** werden Salze und überschüssige Farbstoff-Terminatoren entfernt, welche bei der Kapillarelektrophorese stören würden. Dabei werden zunächst die Sequenzreaktionen mit 25 µl Injection Solution verdünnt und mit der elektronischen Pipette vorsichtig 3 - 5x gemischt, ehe die Übertragung auf den Boden der „wells“ erfolgt. Da nicht alle 96 „wells“ in Verwendung waren, wurden die nicht Befüllten luftdicht abgeklebt, um Vakuum aufbauen zu können. Nun konnte die Reinigungsplatte auf den Vakuumverteiler aufgesetzt und bis zum Erreichen des gewünschten Unterdrucks von 20 - 25 mm Hg angedrückt werden. Für einen optimalen Filtrationseffekt ist es notwendig, den Unterdruck für etwa 3 bis 4 Minuten aufrecht zu halten. In jedem Fall soll jedoch ein Übertrocknen durch zu langes Filtrieren vermieden werden.

Nach Abstellen des Vakuums kann die Unterseite der Reinigungsplatte auf einem Papierhandtuch vorsichtig abgeklopft werden, ehe für den zweiten Waschschrift neuerlich 25 µl Injection Solution in die Filterwells pipettiert und eine Vakuumfiltration angeschlossen wird. Nach der zweiten Filtration wurden die Sequenzproben mit 25 µl Injection Solution resuspendiert, indem mit einer Pipette die Proben 20 x auf- und abpipettiert und in frische 96-well-Sequenzplatten transferiert werden. Luftblasen wurden entfernt und nach dem Zusammenbau des Plattensetups wurde die Platte in den **automatischen „Sequencer“ (ABI 3130xl Genetic Analyzer, Applied Biosystems)** gestellt. Nach Aufruf eines standardisierten Arbeitsprotokolls wurde die Sequenzreaktion, die etwa 2:30 Stunden dauern sollte, gestartet.

Angemerkt sei, dass ein fixes Pipettierschema bei der Befüllung der „wells“ eingehalten werden muss und nicht verwendete „wells“ mit Wasser zu befüllen sind. Es ist grundsätzlich zu vermeiden, dass die Kapillaren des Sequenzierers in Luft tauchen.

Nach der automatisierten Sequenzanalyse wurden die Patientensequenzen mittels **„Sequence-Analysis“-Software (Applied Biosystems)** erfasst, auf eine CD-Rom gebrannt und in weiterer Folge auf einen Analysecomputer importiert. Als Computerprogramm für die Beurteilung der Qualität der Sequenzen wurde die **„Seq-Scape Software Version 2.5“ (Applied Biosystems)** verwendet.

Bei der Qualitätsbeurteilung ist dabei zu beachten, dass im Falle von nicht automatischer Identifikation der Base eine rote Markierung am Bildschirm vorgenommen wird und eine manuelle Beurteilung des vorliegenden Peaks erfolgen muss. Kann auch durch visuelle Nachkontrolle keine eindeutige Zuordnung getroffen werden, muss die Sequenzreaktion wiederholt werden. Die Qualität der Sequenzreaktion spiegelt sich in der scharfen Begrenzung der einzelnen Peaks wider. Grundsätzlich sollten die Signale in einem Intensitätsbereich zwischen 100 und 1000 liegen, um eine valide Mutationdetektion zu gewährleisten. Die einzelnen Farben, die den Purin- und Pyrimidinbasen zugeordnet sind, können selbst definiert werden.

Zudem ist die Software in der Lage, Mutationen durch Vergleich mit einer Referenzsequenz zu erkennen und zu markieren. Dafür ist es notwendig eine entsprechende Sequenz zu importieren. Die „Nucleotide“ Datenbank des „**National Center for Biotechnology Information**“ (abrufbar über Internet unter www.ncbi.nlm.nih.gov/) enthält entsprechende Sequenzen, welche exportiert werden können. Die in der vorliegenden Arbeit verwendete Referenzsequenz hat die GenBank Accession Nummer: nm004924.

Da die auf cDNA basierenden Patientensequenzen zum Teil mangelhafte Qualität zeigten, wurden Analysesysteme etabliert, für die genomische DNA als Ausgangsmaterial eingesetzt werden konnte. Die in unserer Arbeit eingesetzten Primersysteme stammen aus der Arbeit von Kaplan et al. In den **Tabellen 14** und **15** sind die Primer für die Amplifikation der einzelnen Exons sowie für die Sequenzreaktionen zusammengefasst.

Tabelle 14. Primersysteme für die Amplifikation aller Exons des *ACTN4* Gen

	BOOST 5'	BOOST 3'
Exon 1	GCCAGGAAGCGGGACTCTG	TAGCTCGGCGATTCTCCTC
Exon 2	ACCACCCCGAGCCTCAGTTT	GAGAAAAGAGGGGGCGAGACA
Exon 3	CCAGCTGTCCCATTGCTC	GGTGGGTTGCACTTCCTAGA
Exon 4	CTGTTCCCTGCATTTTCTCC	GTGAGAGCAAAGGCACTCG
Exon 5	CGTGTGTCTCTGGCAGTTG	GGAAACTGCCTCCTCTTCT
Exon 6	GGCAGAAGAGTCAGGATTTGA	GACAGTCCACGAGGGGAATA
Exon 7	CCCCACAAAGATTTACAGAG	CAGGCTACCCTTGCTCTGTC
Exon 8	GCTTCCCACAGCCTTGTCCTT	GGAAAAGCCTGGACAGATGA
Exon 9	TTTTGCAGTCAGCAGTGAGG	CTGACCCTTAGCCTTGTTGA
Exon 10_1	CCACGCTCCAGAGTTCCAG	CTGGCCAAACTGCCACAG
Exon 10_2	TCCCATTGTGCCATAAGCTG	GGAGCACAATGCCGAGTGAA
Exon 11	CCACCTCCCCATCTATGGTA	AGCCACTGAACCTGGCTCTA
Exon 12	GAGATCCCTGGAGGGTACGG	TAAGGCCCTTCCCTGGCTTC
Exon 13	AAGCCGCTTCCCTTCTCACC	GGCCTCCAGCTGCTTCTCTG
Exon 14	AGGGAAGCCCTGGAGGTGAG	GACGGTGGTGTAGGGGTTGC
Exon 16	TCCTGGCCATCCACAAGGAG	ATTCCAGGCGCAAGCTCTGT
Exon 17	GGAGCGCTTGGCAGAGAAAA	GCTCAAGCCATCCTCCCCTT
Exon 18	CTGCCCTGTAGCTGGGAAA	CCACCCAGAAGGCAGGACT
Exon 19	CGAGGTTGGGGAAAGGATGA	GCAGGCAGCACAGGACAGTGG
Exon 20	CTGGAGCAGTGGCAGGCTCT	TCTCTCCGCAGTCTCTCAGC
Exon 21	CCAGGTCATCGCTTCTTCA	TGGCCAACCCACAAAGAGAGA

Tabelle 15. Primersysteme für die Amplifikation aller Exons des *ACTN4* Gen

	NEST5'	NEST 3'
Exon 1	GCCTTGGTGCCTTTTCTGGT	ACCCGCCAATTCTTCTCG
Exon 2	TCCCGGGGTCACTGTAAGGA	TCCAAAAGCAGGTTCTCTGC
Exon 3	GCACCCCTTAATAGCTGCAC	GGCCAGCATCATATCAAGA
Exon 4	GAGGGAGGTGGAGGAGGAC	ACCTGCCACCCACTGACTAC
Exon 5	CTGCTATCACTGCTGCTGTTG	ACCTTCCCATGGGCTTGATG
Exon 6	GCCTCTCTGCCACACTGTCT	GCCTGCACAAGGCTCTCC
Exon 7	CCCGCTCACACATCACAC	CCAGAATCATTAGCCCTTC
Exon 8	GGGCTGAGGGTGTGGCTGA	AGGCTGAGGGGGCAGCA
Exon 9	ACAGGGCACCATCTCACTG	ACACACCAGCTGGCTAAATG
Exon 10_1	CCTAAGGTGGGGCCCTCAA	TCCCATTGGAATCCTGGTGCT
Exon 10_2	CCCACAGCTCCTGGAGTGGAT	CGACCACTGCATCCGAAAGG
Exon 11	CGTTCACGCATTCATTTTGT	GAAAGGGCACCTGAGAAACA
Exon 12	CACTGTCAATTGGCATGGAAGG	GGGCACTGGGGACCCTAT
Exon 13	ATGGGCGAGAACCAAGCTGT	GGACAGAGGGGAAGGCAGGTC
Exon 14	GGGGCTGGTGGTGTGGATAG	TCTGGGCCTCCTTGTTGATG
Exon 16	GCCCAGAGGATCGCTGAGAG	CCCTGGGTGGTGAGAATTGG
Exon 17	TTGTGAGCAGTGGGCCTTCC	CCCAAAGTGCTGGTCTCTTCAA
Exon 18	AGACATTGGCAGAGGCAGCA	TTGGTGCCGCACACCTACAC
Exon 19	TGTCCCTGGCCATCTCCTTG	CAGGTAAAAGGGAAGGGGTCCA
Exon 20	CACGCACACGTGGGTTGG	CTGGGGCAGGCAGGATG
Exon 21	GGTGAGCGAGACCCCTACGA	ACCCACCCCGGAGGACTG

Für die Analyse von **Exon 15** wurde nur ein Primersystem für die Amplifikation und die Sequenzreaktion verwendet:

ACTN4-pre15F: 5`-CCCATCTTCCCAAGAGCCTCTG-3`;

ACTN4-pre15R: 5`-CAGAGGAGACGCGGTGTGGGAG-3`.

Tabelle 16. Lage der Exons im ACTN4 Gen (Nukleotidpositionen lt. GenBank Acc No. NG_007082.1)

Exon Nummer	Nuklotidposition	Exongröße in bp
Exon 1	60..221	162
Exon 2	52914..53028	115
Exon 3	53316..53435	120
Exon 4	57248..57334	87
Exon 5	58358..58445	88
Exon 6	60431..60509	79
Exon 7	61709..61790	82
Exon 8	62571..62656	86
Exon 9	66783..66875	93
Exon 10	69400..69630	231
Exon 11	70241..70388	148
Exon 12	73852..74002	151
Exon 13	75928..76036	109
Exon 14	76251..76391	141
Exon 15	76471..76653	183
Exon 16	76745..76879	135
Exon 17	78038..78217	180
Exon 18	79271..79417	147
Exon 19	80260..80340	81
Exon 20	81310..81468	159
Exon 21	81588..81746	159

Um sicher zu stellen, dass bei der Mutationssuche alle Exon-Sequenzen in ausreichend guter Qualität vorhanden sind und um die Möglichkeit einer zusätzlichen Qualitätskontrolle durch Vergleich der Sequenzergebnisse beider Konzeptionen

(cDNA und gDNA) zu erhalten, wurde beschlossen, bei alle PatientInnen Exon 1 – 21 ausgehend von genomischer DNA zu sequenzieren.

Die nun folgenden Protokolle zeigen die PCR-Protokolle und die Ergebnisse der Elektrophorese nach ExoSAP-Verdau. Die Etablierung der PCR, die anschließende Gelelektrophorese, die Färbung mit SybrGreen und die Fotodokumentation erfolgten wie für die cDNA beschrieben.

Tabelle 17. PCR System für die Amplifikation von ACTN4 Exon 2

Mastermix	1x
10x Puffer	2 µl
25 mM MgCl2	1,2 µl
dNTP Mix	1,6 µl
Ex 2 BST fw (10 pmol/µl)	2 µl
Ex 2 BST rv (10 pmol/µl)	2 µl
Gold Taq (5U/µl)	0,1 µl
Wasser	10,1 µl
total	19 µl
DNA	1 µl

PCR Amplifikation: 10 min 95°C, 30 sec 95°C, 30 sec 64°C, 30 sec 72°C, 45 Zyklen, 5 min 72°C, 4°C unendlich

Gelkontrolle nach ExoSAP-Verdau: Exon 2

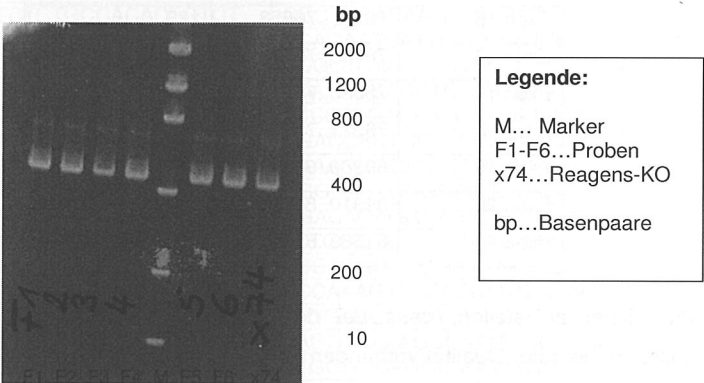


Tabelle 18. PCR System für die Amplifikation von *ACTN4* Exon 3

Mastermix	1x
10x Puffer	2 µl
25 mM MgCl ₂	1,2 µl
dNTP Mix	1,6 µl
Ex 3 BST fw (10 pmol/µl)	2 µl
Ex 3 BST rv (10 pmol/µl)	2 µl
Gold Taq (5 U/µl)	0,1 µl
Wasser	10,1 µl
total	19 µl
DNA	1 µl

PCR Amplifikation: 10 min 95°C, 30 sec 95°C, 30 sec 64°C, 30 sec 72°C, 45 Zyklen, 5 min 72°C, 4°C unendlich

Gelkontrolle nach Exo-SAP-Verdau: Exon 3

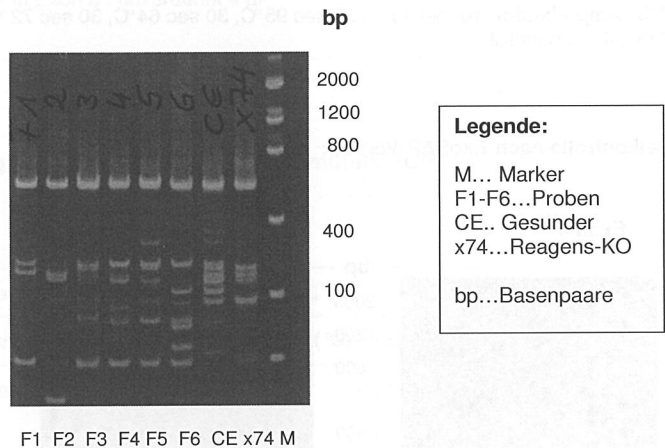
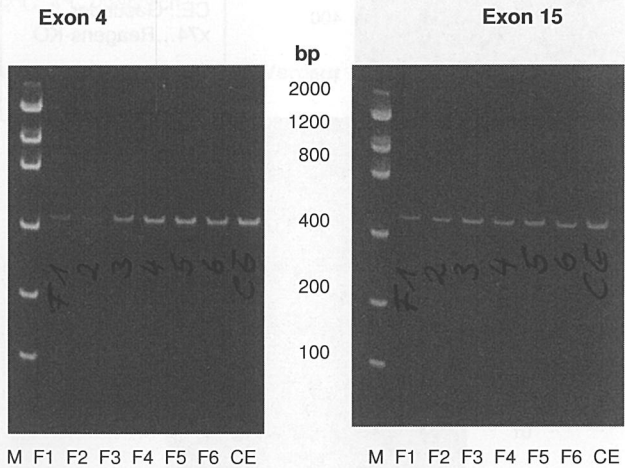


Tabelle 19. PCR Systeme für die Amplifikation von *ACTN4* Exon 4-15 und 17-21

Mastermix	1x
10x Puffer	2 µl
25 mM MgCl ₂	1,2 µl
dNTP Mix	1,6 µl
Ex 4-15, 17-21BST fw (10 pmol/µl)	2 µl
Ex 4-15, 17-21BST rv(10 pmol/µl)	2 µl
Gold Taq (5U/µl)	0,1 µl
Wasser	10,1 µl
total	19 µl
DNA	1 µl

PCR Amplifikation: 10 min 95°C, 30 sec 95°C, 30 sec 64°C, 30 sec 72°C, 45 Zyklen, 5 min 72°C, 4°C unendlich

Gelkontrolle nach ExoSAP-Verdau: Exon 4 und Exon 15



Legende:
M... Marker
F1-F6...Proben
CE...Reagens-KO
bp...Basenpaare

Nach Etablierung der PCR Amplifikationen wurden für die Sequenzreaktionen die Nest-Primer eingesetzt.

Tabelle 20. Sequenzreaktionen für *ACTN4* Exon 4, 5 und 6

Mastermix	1x
RRM (1,6 µl MagicDye + 0,4 µl BigDye)	2 µl
Exon 4,5,6 NST fw + rv Primer (1,6 pmol/µl)	2 µl
5 x Puffer	1,5 µl
HPLC Wasser (variabel)	2,5µl
total	8µl
PCR Produkte	2µl
F4, F5, F6, CE in Exon 4: unverdünnt F1, F3, F4, F5, F6, CE in Exon 5: unverdünnt F1 – F6, CE in Exon 6 : unverdünnt F3 in Exon 4: unverdünnt 3 µl F1, F2 in Exon 4: unverdünnt 4 µl F2 in Exon 5 : unverdünnt 4 µl	

Tabelle 21. Bedingungen für Sequenzreaktion mittels PCR

Sequenzierprimer	NEST4, 5, 6	
Schritt	Temp. (°C)	Zeit
Denaturieren/Aktivieren	96	1 min
Amplifikation (25 Zyklen)	96	10 sec
	59	5 sec
	60	4 min
Finale	4	unendlich

Tabelle 22. Sequenzreaktionen für *ACTN4* Exon 7, 8 und 9

Mastermix	1x
RRM (1,6 µl MagicDye + 0,4 µl BigDye)	2 µl
Exon 7, 8, 9 NST fw + rv Primer (1,6 pmol/µl)	2 µl
5x Puffer	1,5 µl
HPLC Wasser (variabel)	2,5 µl
total	8 µl
PCR Produkt: F1-F6, CE in Ex 7: unverdünnt F1-F6, CE in Ex 8 : unverdünnt F1-F6, CE in Ex 9 : unverdünnt	2µl

Tabelle 23. Bedingungen für Sequenzreaktion mittels PCR

Sequenzierprimer	NEST 7, 8, 9	
Schritt	Temp. (°C)	Zeit
Denaturieren/Aktivieren	96	1 min
Amplifikation (25 Zyklen)	96	10 sec
	59	5 sec
	60	4 min
Finale	4	unendlich

Tabelle 24. Sequenzreaktionen für *ACTN4* Exon 10_1, 10_2, und 11

Mastermix	1x
RRM (1,6 µl MagicDye + 0,4 µl BigDye)	2 µl
Exon 7, 8, 9 NST fw + rv Primer (1,6 pmol/µl)	2 µl
5x Puffer	1,5 µl
HPLC Wasser (variabel)	2,5 µl
total	8 µl
PCR Produkt: F1-6, CE in Ex 10_1 : unverdünnt F1-6, CE in Ex 10_2 : unverdünnt F1-6, CE in Ex 11 : unverdünnt	2µl

Tabelle 25. Bedingungen für Sequenzreaktion mittels PCR

Sequenzierprimer	NEST10_1, 10_2, 11	
Schritt	Temp. (°C)	Zeit
Denaturieren/Aktivieren	96	1 min
Amplifikation (25 Zyklen)	96	10 sec
	59	5 sec
	60	4 min
Finale	4	unendlich

Tabelle 26. Sequenzreaktionen für *ACTN4* Exon 12, 13 und 14

Mastermix	1x
RRM (1,6 µl MagicDye + 0,4 µl BigDye)	2 µl
Exon 12, 13, 14 NST fw + rv Primer (1,6 pmol/µl)	2 µl
5x Puffer	1,5 µl
HPLC Wasser (variabel)	2,5 µl
total	8 µl
PCR Produkt: F1-F6, CE in Ex 12: unverdünnt F1-F6, CE in Ex 13 : unverdünnt F1-F6, CE in Ex 14 : unverdünnt	2 µl

Tabelle 27. Bedingungen für Sequenzreaktion mittels PCR

Sequenzierprimer	NEST12, 13, 14	
Schritt	Temp. (°C)	Zeit
Denaturieren/Aktivieren	96	1 min
Amplifikation (25 Zyklen)	96	10 sec
	59	5 sec
	60	4 min
Finale	4	unendlich

Tabelle 28. Sequenzreaktionen für *ACTN4* Exon 15 und 16

Mastermix	1x
RRM (1,6 µl MagicDye + 0,4 µl BigDye)	2 µl
Exon 15 BST, Ex 16 NST fw + rv Primer (1,6 pmol/µl)	2 µl
5x Puffer	1,5 µl
HPLC Wasser (variabel)	1,5 µl
total	7 µl
PCR Produkt: F1-F6, CE in Ex 15: unverdünnt F1-F6, CE in Ex 16 : unverdünnt	3µl

Tabelle 29. Bedingungen für Sequenzreaktion mittels PCR

Sequenzierprimer	NEST15, 16	
Schritt	Temp. (°C)	Zeit
Denaturieren/Aktivieren	96	1 min
Amplifikation (25 Zyklen)	96	10 sec
	59	5 sec
	60	4 min
Finale	4	unendlich

Das weitere Vorgehen bezüglich Reinigung der Sequenzierprodukte (ExoSAP) und Kapillarelektrophorese war identisch mit den für die cDNA-Systeme erläuterten Protokollen.

Table 1. Data on the number of cases of disease X in the United States, 1980-1990.

Year	Number of cases
1980	100
1981	120
1982	150
1983	180
1984	200
1985	220
1986	250
1987	280
1988	300
1989	320
1990	350

Table 2. Data on the number of cases of disease X in the United States, 1980-1990, by age group.

Year	0-14	15-44	45-64	65+
1980	10	20	30	40
1981	12	22	32	42
1982	15	25	35	45
1983	18	28	38	48
1984	20	30	40	50
1985	22	32	42	52
1986	25	35	45	55
1987	28	38	48	58
1988	30	40	50	60
1989	32	42	52	62
1990	35	45	55	65

Table 3. Data on the number of cases of disease X in the United States, 1980-1990, by sex.

Table 4. Data on the number of cases of disease X in the United States, 1980-1990, by race.

Resultate

Sequenzanalyse mittels PCR System FSGS7/8 auf gDNA Basis

Zunächst wurde die Qualität der Sequenzanalysen beurteilt, das heißt, die Durchgängigkeit und Vollständigkeit der Sequenzen und die eindeutige Zuordnung einer Purin- oder Pyrimidinbase zu jeder einzelnen Position innerhalb des *ACTN4* Gens verifiziert.

Alle Proben (F1-F6, CE) zeigten sowohl für den Forward- als auch den Reverse-Primer DNA-Sequenzen mit sehr niedriger Irrtumswahrscheinlichkeit. Vor allem beim Primer FSGS 7 wurden sehr scharfe Peaks mit Signalintensitäten zwischen 100 – 1000 erreicht. Nur vereinzelt wurden Nukleotidpositionen mit roten Qualitätsbalken markiert. In diesen Fällen war jedoch eine **visuelle Zuordnung der Base** möglich.

Die nicht automatisch zuzuordnenden Basen waren zumeist durch Schultern benachbarter Basen verursacht. Durch dieses Störsignal im Hintergrund war die Erkennung der eigentlichen Base für das Auswerteprogramm nicht möglich. Dieses PCR System ist somit für die Nukleotidsequenzanalyse von Exon 8 geeignet.

Sequenzanalysen auf cDNA Basis

Die mittels Primersystem FSGS1/2, FSGS3/4 und FSGS5/6 generierten Nukleotidsequenzen erfüllten nicht unsere Qualitätskriterien. Im Speziellen fanden sich beim Primersystem FSGS3/4 überlappende Nukleotidsequenzen, die eine einwandfreie Identifikation der Basenabfolge unmöglich machten.

Durch Variation der Komponenten des Mastermix, durch Veränderung der Zykluszahl und der Annealing-Temperaturen wurde versucht, mehr PCR Produkt zu generieren.

Obwohl die PCR-Produkte in ausreichender Quantität amplifiziert wurden, zeigten die Nukleotidsequenzen unvollständige und teilweise überlappende Basenabfolgen.

Da als Ausgangsmaterial polyklonale, durch periphere Blutabnahme gewonnene Leukozyten verwendet wurden, waren wahrscheinlich alternativ gespleißte Transkripte der Grund für die überlappenden Sequenzen.

Sequenzanalysen von Exon 1-21 mittels BOOST/NEST PCR Systemen auf gDNA Basis

Durch Verwendung von Primerpaaren auf Basis genomischer DNA, konnte das Problem der alternativen Speißvorgänge behoben werden. In der Arbeit von Kaplan et alia wurde ein auf genomischer DNA basierendes PCR System beschrieben. Die Primer waren dabei so gewählt, dass sie knapp außerhalb der jeweiligen Exons lagen. Die Boost-Primer bildeten dabei die weiter vom Exon entfernt gelegenen Einheiten, die Nest-Primer flankierten das jeweilige Exon enger. Mit den eingesetzten Analysesystemen konnten bis auf Exon 1 und Exon 21 alle Exons auf das Vorhandensein von Mutationen untersucht werden. Die in der unten folgenden **Tabelle 30** angeführten Ergebnisse für Exon 21 basieren auf den Sequenzierungen mit cDNA, wie eingangs beschrieben.

Identifizierte Mutationen im *ACTN4* Gen

Im Exon 5 und Exon 20 wurden Abweichungen von der Wild-Typsequenz identifiziert.

Tabelle 30 soll einen Überblick über die bei unseren PatientInnen gefundenen Mutationen zeigen.

Tabelle 30. Mutationen im *ACTN4* Gen bei PatientInnen mit Verdacht auf FSGS vom Typ 1

Patient Nr.	Exon 1	Exon 2	Exon 3	Exon 4	Exon 5	Exon 6	Exon 7
F1	WT	WT	WT	WT	596 G>A het GTA>ATA 179P > P 605C>T het AAC>AAT L182L	WT	WT
F2	WT	WT	WT	WT	596 G>A het GTA>ATA 179P>P 605C>T het AAC>AAT L182L	WT	WT
F3	WT	WT	WT	WT	605C>T het AAC>AAT L182L	WT	WT
F4	WT	WT	WT	WT	605C>T het AAC>AAT L182L	WT	WT
F5	WT	WT	WT	WT	596G>A het GTA>ATA 179P>P	WT	WT
F6	WT	WT	WT	WT	605C>T hom AAC>AAT L182L	WT	WT
E64*	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT

Patient Nr.	Exon 8	Exon 9	Exon 10	Exon 11	Exon 12	Exon 13	Exon 14
F1	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT
F2	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT
F3	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT
F4	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT
F5	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT
F6	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT
E64*	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT

Patient Nr.	Exon 15	Exon 16	Exon 17	Exon 18	Exon 19	Exon 20	Exon 21
F1	WT	WT	WT	WT	WT	2622T>C het TTA>CTA L855L	WT
F2	WT	WT	WT	WT	WT	2622T>C het TTA>CTA L855L	WT
F3	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT
F4	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT
F5	WT	WT	WT	WT	WT	2622T>C het TTA>CTA L855L	WT
F6	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT
E64*	WT	WT	WT	WT	WT	2622T>C het TTA>CTA L855L	WT

* gesunder Proband als Kontrolle; WT, Wild-Typ; het, heterozygot; hom, homozygot

Die in Exon 20 vorliegende Punktmutation zeigt einen Austausch des an der 2622. Position gelegenen Thymins gegen Cytosin (*ACTN4* 2622T>C), wodurch es zu einer Veränderung des Tripletcodes von TTA nach CTA kommt. Diese Variation wurde auch bei einer gesunden Kontrollpatientin detektiert.

Die in Exon 5 in Nukleotidposition 605 identifizierte Sequenzalteration, führt zu einem Austausch von Cytosin durch Thymin. In der Folge wird als Triplet anstelle von AAC nunmehr AAT kodiert. Die PatientInnen F1-F5 zeigen an dieser Position eine heterozygote Anlage, während Patient F6 die Mutation homozygot trägt. Auch hier wird die kodierte Aminosäure nicht verändert (Asparagin, synonyme Mutation).

Die PatientInnen F1, F2 und F5 zeigen in Exon 5 eine weitere von der Wildtypsequenz abweichende Sequenz an der Nukleotidposition 596, wobei es zu einem Ersatz von Guanin durch Adenin mit der Konsequenz der Triplettänderung von CCG nach CCA kommt, welche jedoch ebenso hinsichtlich der kodierte Aminosäure (in beiden Fällen wird Prolin kodiert) keine Konsequenz nach sich zieht.

Diskussion

In unserer Familie mit Verdacht auf FSGS1 wurden drei Mutationen identifiziert. Die Mutationen in Exon 5 (*ACTN4* 596G>A (P179P) und 605C>T (N182N)) wurden bei erkrankten und gesunden Familienangehörigen identifiziert. Die Mutation *ACTN4* 2622T>C (L855L) im Exon 20 wurde bei allen Familienmitgliedern und einer gesunden Kontrolle detektiert.

Die Mutation *ACTN4* 2622T>C ist im Kodon 855 lokalisiert und führt zu keiner Substitution der Aminosäure Leucin (L855L). Diese Mutation wurde auch bei unserer gesunden Kontrolle identifiziert, sodass es sich hierbei wahrscheinlich um einen genetischen Polymorphismus handelt, der nicht mit der Krankheit assoziiert ist. Die Mutation *ACTN4* 596G>A ist im Kodon 179 lokalisiert und führt zu keiner Änderung der Aminosäurenabfolge (P179P). Diese Mutation ist in der ENSEMBL Datenbank als genetischer Polymorphismus eingetragen. Die Mutation *ACTN4* 605C>T (N182N) ist ebenfalls in der Datenbank als synonymer Polymorphismus gelistet, sodass es sich bei allen in unserer Familie identifizierten Mutationen um genetische Polymorphismen zu handeln scheint.

Bei der Nukleotidsequenzanalyse der auf RNA basierenden PCR Systeme FSGS1/2, FSGS3/4 und FSGS5/6 fanden sich überlappende Sequenzen, die wahrscheinlich durch Spleißingvarianten verursacht sind. Bei der primären Transkription der genomischen DNA entsteht zunächst ein Transkript, das als **prä-mRNA** bezeichnet wird und mit Hilfe von speziellen Organellen (Spleißosomen) weiter verarbeitet wird. Simplifiziert werden die kodierenden Exons von den nicht-kodierenden Introns getrennt, die Exons ligiert und die Enden mit einer CAP-Region (5'-Ende) und einem Poly-A-Schwanz (eine am 3'-Ende ablaufende Poly-Adenylierung) versehen. Letztere Mechanismen verhindern eine zu rasche Degeneration der mRNA und sind somit als Schutzmechanismen zu verstehen. In **monoklonalen Zellen** fällt der Vorgang des Speißens (englisch Splicing) einheitlich aus, die mRNA Sequenz ist bei allen Zellen gleich beschaffen. Bei **polyklonalen Zellen** hingegen tritt der Umstand in Kraft, dass nicht in allen Zellen die gleiche mRNA generiert wird, sondern durch alternatives Spleißen Varianten mit unterschiedlichen Basensequenzen.

Versucht man nun polyklonale Leukozyten, die aus Lymphozyten und Granulozyten bestehen zu sequenzieren, finden sich bei Vorhandensein von „splicing“ Varianten überlappende Nukleotidsequenzen, welche nicht gelesen werden können. Es ist bekannt, dass das *ACTN4* Gen alternativ gespleißt wird. In der ENSMBL Datenbank sind z.B. Transkripte mit einer Länge von 3893 bp und einer Länge von 4963 bp eingetragen. Die in unserer Arbeit beobachteten überlappenden Sequenzen könnten somit durch „splicing“ Varianten verursacht sein.

Bei der Anwendung von jenen von Kaplan et al. veröffentlichten Analysesystemen für Exon 1 und Exon 21 konnten keine für die Sequenzanalyse geeigneten PCR Produkte generiert werden. Ursache dafür könnte das Vorhandensein von SNPs in den Primerregionen sein. In der Literatur sind Polymorphismen an den Nukleotidpositionen 60 (Exon 1) und 2666 (Exon 21) beschrieben. Um dieses Problem zu lösen, werden derzeit neue Analysesysteme für Exon 1 und 21 etabliert. Zum jetzigen Zeitpunkt kann nicht ausgeschlossen werden, dass in Exon 1 bei den untersuchten Patienten Mutationen vorliegen (Exon 21 konnte auf cDNA Ebene analysiert werden). Da in der Literatur bis dato keine krankheitsrelevanten Mutationen in Exon 1 beschrieben wurden, ist es unwahrscheinlich, dass die kausalen Mutationen in unserer Familie im Exon 1 lokalisiert sind.

Im Vergleich zu den Arbeiten von Kaplan et al. (2000) sowie von Weins et al. (2005) wurde keine der bis dato beschriebenen Mutationen (W59R; I149del; R310Q; Q348R; V801M; R837Q; K228E; T232I; S235P) in unserem Patientengut gefunden. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass die in unserer Arbeit identifizierten genetischen Polymorphismen zu einer Veränderung der Aktinbindungsfähigkeit mit einer konsekutiven pathologischen intrazellulären Aggregation des alpha-Aktininproteins führen. Hierzu wäre eine elektronenmikroskopische Analyse wie von Weins et al. 2005 publiziert, nötig.

Darüber hinaus könnten Mutationen in anderen Genen (z.B. *TRPC6*) vorliegen, die bei zu einer primären FSGS führen. Ferner könnten Mutationen in Introns des *ACTN4* Gens oder große Gendefekte (Deletionen, Insertionen, Duplikationen) vorliegen, die mit den eingesetzten Analysesystemen nicht erfasst wurden.

Die von Kaplan et al. publizierten Sequenzalterationen sind in der **Abbildung 11** dargestellt. Die Arbeitsgruppe hatte dafür jene von uns eingesetzten cDNA-Primer zur Amplifikation eingesetzt, als Ausgangsmaterial jedoch monoklonal expandierte Lymphoblasten verwendet.

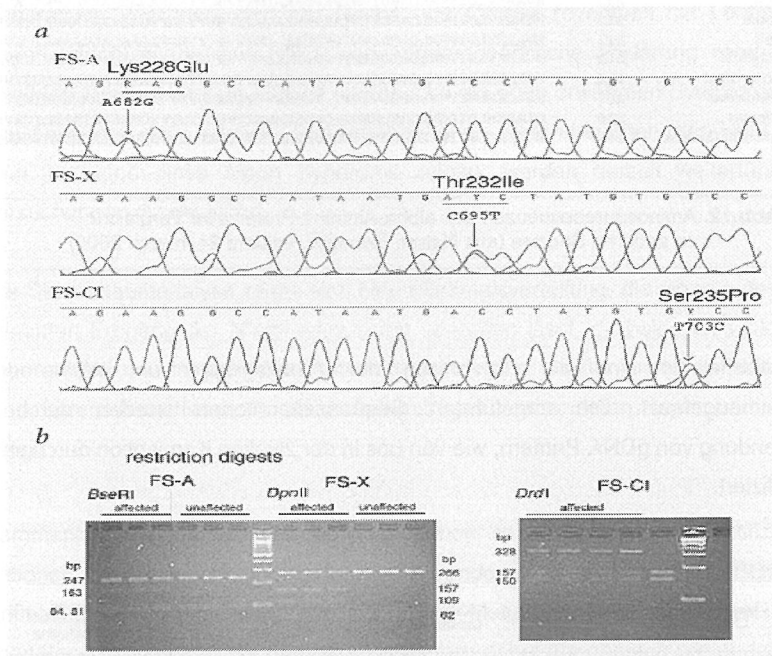


Abb. 11. Sequenzanalyse im *ACTN4* Gen: Mutationen bei drei Familien mit FSGS Typ 1 (aus Nature Genetics, volume 24, march 2000)

Abbildung 12 veranschaulicht die Auswirkungen der Mutationen auf die Aminosäuresequenz des *ACTN4*-Proteins. Interessant ist der hohe Konservierungsgrad innerhalb der evolutionären Entwicklung und die hohe Sequenzhomologie zu β -Spektrin.

human ACTN4	202	EVAEKYLDIPKMLDAEDIVNTARFDEKAIMTVVSSFYHAPSGAQKAETAANRICKVL
family FS-A		-----E-----
family FS-X		-----I-----
family FS-CI		-----P-----
human ACTN1	210	DVAEKYLDIPKMLDAEDIVGTARPDEKAIMTVVSSFYHAPSGAQKAETAANRICKVL
human ACTN2	217	EIAEKHLDPKMLDAEDIVNTPKPDRAIMTVVSCFYHAPAGAEQAETAANRICKVL
human ACTN3	224	EVAEKYLDIPKMLDAEDIVNTPKPDRAIMTVVSCFYHAPAGAEQAETAANRICKVL
rat	210	DVAERYLDIPKMLDAEDIVGTARPDEKAIMTVVSSFYHAPSGAQKAETAANRICKVL
mouse	223	EVAEKYLDIPKMLDAEDIVNTPKPDRAIMTVVSCFYHAPAGAEQAETAANRICKVL
chicken	222	EVAEKYLDIPKMLDAEDIVNTPKPDRAIMTVVSSFYHAPSGAQKAETAANRICKVL
rabbit	223	EVAEKYLDIPKMLDAEDIVNTPKPDRAIMTVVSCFYHAPAGAEQAETAANRICKVL
<i>Drosophila</i>	213	DVAEKYLDIPKMLDPPDLINTPKPDRAIMTVVSCYHAPQGAQAETAANRICKVL
<i>Dictyostelium</i>	112	DIAEKELDPKMLDVSDMLDVVRPDRSRWMTYVQYIYHHFASRKAETAGKQVGKVL
<i>Trichomonas</i>	201	PAACKELGIYVYLDPEDVIDTT - PDEKSVVTQVAEPFHFPAESKIAAMADKIKRTV
<i>C. elegans</i>	216	DIAEKHLDPKMLDAEDMANS-QPDEKAWMTTVVSCYHYPFSGMRKAETAANRICKVL
β -spectrin (human)	240	NVAERQLGIIPLLDPEDVF - TENPDEKSLITTVVAFYHYPFSKMKVLAVEGKRVGKVI

Abb.12. Aminosäuresequenzen des alpha-Aktinin4-Proteins im Vergleich zu anderen Spezies (aus Nature Genetics, volume 24, march 2000)

In **Tabelle 31** sind die Ergebnisse der Arbeitsgruppe um Weins et al zusammengefasst. Die angeführten Sequenzalterationen wurden durch die Verwendung von gDNA-Primern, wie von uns in der zweiten Konzeption durchgeführt identifiziert.

Table 1. Amino acid substitutions*

Amino Acid Change	Nucleotide Change	SIFT	PolyPhen	Cellular Localization	Altered F-Actin Binding	Allele Frequencies in Controls	Co-Segregation with Phenotype in Pedigree	Disease Causing or Contributing
A6T	C16G	Tolerated	Benign	ND	ND	ND	No	No
W59R	C175T	Affects function	Probably damaging	Abnormal	Yes	0	Yes	Yes
I149del	del(445-447)	NA	NA	Abnormal	Yes	0	Yes	Yes
K255F ^b	A763G	Affects function	Benign	Abnormal	Yes	0	Yes	Yes
T259I ^b	C776T	Affects function	Possibly damaging	Abnormal	Yes	0	Yes	Yes
S262P ^b	T784C	Affects function	Possibly damaging	Abnormal	Yes	0	Yes	Yes
R310Q	G929A	Tolerated	Possibly damaging	Normal	No	0.0074 (8/1084) controls 0.016 (3/192) sporadic FSGS	No	Probably not
Q348R	A1046G	Affects function	Possibly damaging	Normal	No	0	NA	Probably not
A427T	C1292G	Tolerated	Benign	ND	ND	ND	No	No
V801M	G2401A	Affects function	Benign	Abnormal	No	0.005 (5/961)	Yes	Probably not
R837Q	G2511A	Affects function	Benign	Normal	No	0	No	Probably not

*ND, not done; NA, not available.

^bPreviously reported (1).

Tabelle 31. Mutationen und Sequenzalterationen des *ACTN4* Gens (aus J Am Soc Nephrol 16: 3694-3701, 2005)

In unserer Familie wurde bei einem Mitglied anhand von Nieren- bzw. Hautbiopsien der dringende Verdacht auf ein autosomal vererbtes Alport-Syndrom mit Kollagen-IV-Alpha-5-Synthase-Defekt geäußert. Die klinischen Symptome betreffend, war ein Alport-Syndrom nicht die primäre Verdachtsdiagnose, da kein typischer sensorischer Hörverlust (initial vornehmlich hohe Frequenzen) und keine degenerativen Veränderungen der Retina und Cornea (eventuell mit Lenticonus) vorlagen (hierzu wurde eine HNO- und Augenfachärztliche Abklärung veranlasst). Bei keinem Mitglied unserer Familie fanden sich die eben erwähnten Symptome. Um auszuschließen, dass weitere Familienangehörige Veränderungen der Haut bzw. Nieren im Sinne eines Alport Syndroms zeigen, werden derzeit weiterführende Untersuchungen durchgeführt.

In der Stammbaumanalyse zeigte sich eine Merkmalsverteilung, die einen autosomal dominanten Erbgang der Nierenerkrankung vermuten lässt, da beide Geschlechter gleichermaßen und in jeder Generation betroffen sind. Unklar bleibt die Rolle der Partner bereits Betroffener, die selbst Anlageträger einer anderen Nephropathie sein könnten.

Zusammenfassend handelt es sich bei jenen in dieser Arbeit identifizierten Mutationen um keine Defekte, die bereits bei anderen PatientInnen mit FSGS1 im Schrifttum beschrieben sind. Da alle drei Mutationen auch bei gesunden ProbandInnen identifiziert wurden, handelt es sich dabei am ehesten um genetische Polymorphismen, welche nicht kausal mit der Erkrankung assoziiert sind. Die hereditäre Nephropathie in unserer Familie ist wahrscheinlich durch einen anderen Gendefekt verursacht.

Literaturverzeichnis

Honda K, Yamada T, Endo R, Ino Y, Gotoh M, Tsuda H, Yamada Y, Chiba H, Hirohashi S:

Actinin-4, a Novel Actin-bundling Protein Associated with Cell Motility and Cancer Invasion

The Journal of Cell Biology 140: 1383-1393, 1998

Kaplan J M, Kim S H, North K N, Rennke H, Correia L A, Tong H Q, Mathis B J, Rodriguez-Perez J C, Allen P G, Beggs A H, Pollak M R:

Mutations in ACTN4, encoding alpha-actinin-4, cause familial focal segmental glomerulosclerosis

Nature Genetics 24: 251-256, 2000

Nikolopoulos S N, Spengler B A, Kisselbach K, Evans A E, Biedler J L, Ross R A:

The human non-muscle alpha-actinin protein encoded by the ACTN4 gene suppresses Tumorigenicity of human neuroblastoma cells

Oncogene 19: 380-386, 2000

Online Mendelian Inheritance in Men, www.ncbi.nlm.gov/sites/entrez

OMIM 603278; OMIM 604638; OMIM 603965

Tryggvason K, Patrakka J, Wartiovaara J:

Hereditary Proteinuria Syndromes and Mechanisms of Proteinuria

New England Journal of Medicine 354: 1387-1401, 2006

Weins A, Kenlan P, Herbert S, Le C, Villegas I, Kaplan B S, Appel G B, Pollak M R:

Mutational and Biological Analysis of alpha-Actinin-4 in Focal Segmental Glomerulosclerosis

J Am Soc Nephrol 16: 3694-3701, 2005

Sonstige Quellen:

Böcker W, Denk H, Heitz Ph U (Herausgeber): Glomeruläre Erkrankungen, in **Pathologie**, Verlag Urban und Fischer, 2. Auflage: 782-795, 2001

Curran R C, Crocker J (Herausgeber): Niere, ableitende Harnwege, Fokale Segmentale Glomerulonephritis, in **Atlas der Histopathologie**, Springer-Verlag, 5. Auflage: 182, 2000

Janning W, Knust E (Herausgeber): Transkription und Translation, in **Genetik: Allgemeine Genetik-Molekulare Genetik-Entwicklungsgenetik**, Thieme-Verlag, 1. Auflage: 169-198, 2004

Knippers R (Herausgeber): Klonieren und Sequenzieren, in **Molekulare Genetik**, Thieme-Verlag, 8. Auflage: 287-313, 2001

Murken J, Cleve H (Herausgeber): DNA-Untersuchung, diagnostische Anwendung beim Menschen, in **Humangenetik**, Enke Verlag, 6. Auflage: 1-17, 1996

Renz-Polster H, Braun J (Herausgeber): Glomeruläre Erkrankungen, Nierenersatztherapie, in **Basislehrbuch Innere Medizin**, Verlag Urban und Fischer, 2. Auflage: 867-904, 2001

Tariverdian G, Buselmaier W (Herausgeber): Molekulare Grundlagen der Humangenetik, in **Humangenetik**, Springer-Verlag, 3. Auflage: 3-52, 2003

Abbildungen:

Abbildung 1, Seite 8:

Atlas der Histopathologie;

Curran; Crocker; 5. Auflage, Springer-Verlag: 182, 2000

Abbildung 2, Seite 8:

Mutations in ACTN4, encoding alpha-actinin-4, cause familial focal segmental glomerulosclerosis;

Kaplan et al; Nature Genetics, Volume 24: 252, March 2000

Abbildung 3, Seite 9:

Hereditary Proteinuria Syndromes and Mechanisms of Proteinuria;

Tryggvason et al;

New England Journal of Medicine 354: 1388, March 30, 2006

Abbildung 4, Seite 11:

Hereditary Proteinuria Syndromes and Mechanisms of Proteinuria;

Tryggvason et al;

New England Journal of Medicine 354: 1394, March 30, 2006

Abbildung 5, Seite 14:

Mutational and Biological Analysis of alpha-Actinin-4 in Focal Segmental Glomerulosclerosis

Weins et al; J Am Soc Nephrol 16: 3698, 2005

Abbildung 6, Seite 21:

Mutations in ACTN4, encoding alpha-actinin-4, cause familial focal segmental glomerulosclerosis;

Kaplan et al.; Nature Genetics, Volume 24: 251, March 2000

Abbildung 7, Seite 22:

Swiss Institute of Bioinformatics: ExPASy (Expert Protein Analysis System)

Proteomics Server; www.expasy.org ; ACTN4_human; Sequence information;

Primary accession number: O43707

Abbildung 8, Seite 24:

Humangenetik;

Murken; Cleve; 6. Auflage, Enke-Verlag: 11, 1996

Abbildung 9, Seite 31:

Molekulare Genetik;

Knippers; 8. Auflage, Thieme-Verlag: 308, 2001

Abbildung 10, Seite 32:

exemplarischer Befund einer automatisierten Sequenzanalyse

Ausdruck nach Analyse am 3130xl Sequencer, Firma ABI (Applied Biosystems)

Klinisches Institut für Molekularbiologische und Chemische Labordiagnostik,

AKH Wien (Medizinische Universität)

Abbildung 11, Seite 53:

Mutations in ACTN4, encoding alpha-actinin-4, cause familial focal segmental glomerulosclerosis;

Kaplan et al.; Nature-Genetics Volume 24: 252, March 2000

Abbildung 12, Seite 54:

Mutations in ACTN4, encoding alpha-actinin-4, cause familial focal segmental glomerulosclerosis;

Kaplan et al; Nature-Genetics Volume 24: 253, March 2000

Appendix

Reagenzien, die in der vorliegenden Arbeit verwendet wurden und Herstellerfirmen

<i>Reagens</i>	<i>Hersteller</i>	<i>Anwendungszweck</i>
QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit (ist CE zertifiziert)	Qiagen	DNA Isolierung
Agarose ultrapure	BioRad	DNA Gelkontrolle
Ethidiumbromid	Sigma	DNA Gelkontrolle
Primer GLA1 GLA 2 GLA 3 GLA4 GLA5 GLA6 GLA7 GLA8	MWG	PCR Primer
Low DNA Mass Ladder	Invitrogen Life Technologies	Bestimmung der Menge PCR Produkte
Nukleotide	Pharmacia	PCR
Taq DNA Polymerase	Applied Biosystems	PCR
10 x PCR Puffer, MgCl ₂	Applied Biosystems	PCR
Steriles Wasser Aqua bidest	Medipharm	PCR
Polyacrylamid Gel 6%	Novex, ICN	PCR Produkt -Gelkontrolle
5 x Loading Buffer	AL/Elchrom Scien	PCR Produkt -Gelkontrolle DANN Gelkontrolle
10 x TBE Puffer Konzentrat	SIGMA	

Reagens	Hersteller	Anwendungszweck
Sybr Green	EU-Bio	PCR Gelkontrolle
pBR322 / Msp I Digest	NEB	PCR Gelkontrolle
Aqua bidest Kanister, steril	Apotheke	
ExoSAP-IT	USB Corporation	Reinigung PCR Produkte vor Cycle Sequencing
ABI PRISM BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems	Cycle Sequencing
Magic Dye	Red Rabbit	Cycle Sequencing
HPLC Wasser 1.5 L 2.5 L	Merck	Cycle Sequencing
Aqua bidest Infusion	Medipharma	Cycle Sequencing
Montage SEQ96 Sequencing Reaction Cleanup Kit	Millipore LSKS 09624	Aufreinigung PCR Produkt nach Cycle Sequencing
10 x Genetic Analyzer Buffer with EDTA	Applied Biosystems	Laufpuffer Elektrophorese
Gelpolymer POP6	Applied Biosystems	Kapillar-Elektrophorese

Die VDM Verlagsservicegesellschaft sucht für wissenschaftliche Verlage abgeschlossene und herausragende

**Dissertationen, Habilitationen,
Diplomarbeiten, Master Theses,
Magisterarbeiten usw.**

für die kostenlose Publikation als Fachbuch.

Sie verfügen über eine Arbeit, die hohen inhaltlichen und formalen Ansprüchen genügt, und haben Interesse an einer honorarvergüteten Publikation?

Dann senden Sie bitte erste Informationen über sich und Ihre Arbeit per Email an info@vdm-vsg.de.

Sie erhalten kurzfristig unser Feedback!

VDM Verlagsservicegesellschaft mbH

Dudweiler Landstr. 99
D - 66123 Saarbrücken

Telefon +49 681 3720 174
Fax +49 681 3720 1749

www.vdm-vsg.de

Die VDM Verlagsservicegesellschaft mbH vertritt



Südwestdeutscher Verlag
für Hochschulschriften

Eine familiäre Häufung von Niereninsuffizienz mit dem Erstsymptom Proteinurie - Ausgangspunkt für die Aufarbeitung im Rahmen einer Diplomarbeit mit dem Fokus auf die genetischen und molekularbiologischen Hintergründe der Erkrankung und dem Ziel, den zugrunde liegenden genetischen Defekt mittels Mutationsanalyse zu charakterisieren. Unter der Arbeitsdiagnose FSGS wird nach Erstellen eines Stammbaumes auf Basis von bereits publizierten Sequenzanalysen begonnen, das primär auf Mutation suspektierte ACTN4-Gen der Familienangehörigen mittels moderner molekularbiologischer Methoden zu sequenzieren. Hierbei wird die Grenze der Methodik mit dem Versuch, die Sequenzierung auf cDNA-Basis durchzuführen, erreicht, weshalb ein neues Konzept auf Basis von gDNA etabliert werden muss. Aufgeführt sind in diesem Werk neben differentialdiagnostischen Überlegungen auch allgemeine molekulare Hintergründe, die zur funktionellen Störung der glomerulären Basalmembran führen. Daneben findet der interessierte Leser auch sämtliche etablierte PCR- Protokolle der verwendeten Primersysteme, ehe abschließend die Methodik, Ergebnisse und möglichen Konsequenzen diskutiert werden.



Alexander Zeilner

Dr. med. univ, Mag. rer. nat. Geboren am 15. März 1979 in Steyr/Oberösterreich, Matura am Bundesrealgymnasium Steyr 1997, Studium der Humanmedizin und Biologie (Anthropologie) an der Universität Wien 1998 bis 2007. Seit 2008 Arzt für Allgemeinmedizin, derzeit in Ausbildung zum Facharzt für Innere Medizin im LKH Steyr.



9 783639 263817

978-3-639-26381-7

