

Aus der Kinderklinik und Kinderpoliklinik
im Dr. von Haunerschen Kinderspital
Klinikum der Universität München

Direktor: Herr Prof. Dr. med. Dr. sci. nat. Christoph Klein

Genotyp-Phänotyp-Korrelation bei Alport-Patientinnen und Alport-Patienten

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Sonja Beicht
aus
München

Jahr
2015

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München**

Berichterstatter: Herr Prof. Dr. med. L. Weber

Mitberichterstatter: Herr PD Dr. rer. biol. hum. Maciej Lech
Frau Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Lesca M. Holdt
Frau Prof. Dr. med. Ortrud Steinlein

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Frau PD Dr. med. J. Höfele

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 30.04.2015

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Das Alport-Syndrom	1
1.1.1	Erstbeschreibung und Definition	1
1.1.2	Ätiologie	2
1.1.3	Genetik	4
1.1.4	Physiologie und Pathologie	5
1.1.5	Klinik	5
1.1.6	Diagnostik	7
1.1.6.1	Klinische Diagnosekriterien	7
1.1.6.2	Histologische und immunhistologische Diagnostik	7
1.1.6.3	Molekulargenetische Diagnostik	9
1.1.7	Differentialdiagnosen	10
1.1.8	Therapie	10
1.1.9	Stand der Forschung	12
1.2	Ziel der Arbeit	13
2	Patienten, Methoden und Materialien	14
2.1	Patienten	14
2.2	Methoden	14
2.2.1	Allgemeine Vorgehensweise	14
2.2.2	Extraktion der Nukleinsäure	15
2.2.2.1	Manuelle DNA-Isolierung	15
2.2.2.2	Automatisierte DNA-Isolierung	16
2.2.3	Vermessung der Konzentration und Reinheit der DNA	18
2.2.4	Amplifikation der Nukleinsäure	18
2.2.4.1	Die Polymerasekettenreaktion	18
2.2.4.2	Ablauf der Polymerasekettenreaktion	19
2.2.5	Detektion der PCR-Produkte: Agarosegelelektrophorese und Gelfärbung mit Ethidiumbromid	20
2.2.6	Aufreinigung der PCR-Produkte	21
2.2.7	Sequenzierung	22
2.2.7.1	Ansatz und Fällung	22

2.2.7.2	DNA-Sequenzanalyse und Auswertung	23
2.2.7.3	Begriffsdefinitionen	24
2.2.8	Materialien	25
2.2.9	Der Fragebogen	27
3	Ergebnisse	34
3.1	Patientenkollektiv	34
3.1.1	Mutationsverteilung	36
3.1.2	Ergebnisse der Sequenzanalyse	40
3.2	Hämaturie	50
3.2.1	Mutationen in <i>COL4A5</i>	50
3.2.2	Mutationen in <i>COL4A4</i>	52
3.2.3	Mutationen in <i>COL4A3</i>	52
3.3	Proteinurie	53
3.3.1	Mutationen in <i>COL4A5</i>	53
3.3.2	Mutationen in <i>COL4A4</i>	55
3.3.3	Mutationen in <i>COL4A3</i>	55
3.4	Hörstörungen	55
3.4.1	Mutationen in <i>COL4A5</i>	55
3.4.2	Mutationen in <i>COL4A4</i>	57
3.4.3	Mutationen in <i>COL4A3</i>	58
3.5	Augenveränderungen	58
3.5.1	Mutationen in <i>COL4A5</i>	58
3.5.2	Mutationen in <i>COL4A4</i>	59
3.5.3	Mutationen in <i>COL4A3</i>	60
3.6	Hypertonie	60
3.6.1	Mutationen in <i>COL4A5</i>	60
3.6.2	Mutationen in <i>COL4A4</i>	62
3.6.3	Mutationen in <i>COL4A3</i>	62
3.7	Zusammenfassung der Ergebnisse	62
4	Diskussion	66
5	Zusammenfassung	71

6	Literaturverzeichnis	74
7	Abbildungsverzeichnis	79
8	Tabellenverzeichnis	80
9	Abkürzungsverzeichnis	81
10	Danksagung	82
11	Lebenslauf	83
12	Vorträge, Publikationen und Poster	84

1 Einleitung

1.1 Das Alport-Syndrom

1.1.1 Erstbeschreibung und Definition

Leonard Guthrie beschrieb bereits 1902 eine Familie, in der zwölf Mitglieder eine rezidivierende Hämaturie aufwiesen. Er stellte fest, dass die Erkrankung nur von Müttern auf ihre Kinder übertragen wird. Keiner der Betroffenen wies zu diesem Zeitpunkt Anzeichen einer terminalen Niereninsuffizienz auf. Er nannte die Erkrankung „idiopathische oder kongenitale familiäre Hämaturie“ (Guthrie 1927). Die Familie wurde weiterhin durch Arthur Frederick Hurst untersucht. Er beschrieb den Verlauf bei 16 Mitgliedern der Familie in drei Generationen und nannte die Erkrankung „hereditäre familiäre kongenitale hämorrhagische Nephritis“ (Hurst 1923; Hurst 1927). Schließlich erkannte 1927 Arthur Cecil Alport, dass Taubheit eine syndromale Komponente der Erkrankung ist. Er beobachtete außerdem, dass die Erkrankung bei Männern tendenziell schwerer verläuft als bei Frauen. Die Lebenserwartung der Männer war im Gegensatz zu Frauen vermindert (Alport 1927). Mit der Zeit wurden mehr Familien mit derselben Symptomatik beschrieben, und Alport wurde 1961 zum Namensgeber der Erkrankung verabschiedet (Williamson 1961).

Heute weiß man, dass das Alport-Syndrom eine genetisch bedingte progressive Erkrankung der Nieren ist. Sie geht mit Hämaturie, Proteinurie und progressivem Nierenversagen (ESRD, end-stage renal disease) einher. Des Weiteren leiden 60-80% aller Patienten an einer sensorineuralen Hörminderung und 25-40% an spezifischen Augenveränderungen (Gross, Koepke und Weber 2004). Außerdem können auch andere Symptome auftreten, wie beispielsweise mentale Retardierung und Leiomyomatose (Xu et al. 2010; Meloni et al. 2002; Anker et al. 2003).

1.1.2 Ätiologie

Beim Alport-Syndrom handelt es sich um eine genetisch bedingte Erkrankung primär der Nieren aufgrund einer Fehlbildung des Typ-IV-Kollagens (Kashtan 2000). Das Typ-IV-Kollagen gehört zu einer Familie von Kollagenproteinen von mindestens 28 Mitgliedern (Lüllmann-Rauch 2009). Es kommt unter anderem in der Basalmembran der Glomeruli der Nieren vor. Die Basalmembran der Glomeruli ist ein Filter, in dem neben dem Typ-IV-Kollagen Laminin, Nidogen und das negativ geladene Glykosaminoglykan eingelagert sind (Klinke, Pape und Silbernagl 2005). Typ-IV-Kollagen-Moleküle werden von Endothel- und Epithelzellen sezerniert. Sie bilden dann selbstständig polygonale Netzwerke und interagieren mit den anderen Bestandteilen der Basalmembran. Die Fähigkeit der glomerulären Basalmembran als Filter zu fungieren und nur eine minimale Passage von Proteinen zu gewähren, beruht unter anderem auf dem Typ-IV-Kollagen (Kashtan 2000).

Die Gene *COL4A1*, *COL4A2*, *COL4A3*, *COL4A4*, *COL4A5* und *COL4A6* kodieren für sechs α -Proteinketten des Typ-IV-Kollagens, $\alpha 1(IV)$ bis $\alpha 6(IV)$. Jede Proteinkette besteht aus drei Domänen. Die erste ist eine kurze 7S-Domäne am NH_2 -Ende des Proteins. Darauf folgt eine lange Kollagen-Domäne, in der jede dritte Aminosäure Glycin darstellt. Dies ist wichtig, damit sich drei α -Proteinketten zu einer Trippelhelix zusammenfügen können. Am $COOH$ -Ende des Proteins befindet sich eine Nicht-Kollagen-Domäne (NC1-Domäne). Jeweils drei der α -Proteinketten bilden als Trippelhelix ein sogenanntes Protomer. Wahrscheinlich bestimmen variable Anteile in den NC1-Domänen, welche α -Proteinkette mit welcher interagieren kann. Es gibt drei verschiedene Protomere, die sich in ihrer Kettenzusammensetzung unterscheiden: $\alpha 1.\alpha 1.\alpha 2$, $\alpha 3.\alpha 4.\alpha 5$ und $\alpha 5.\alpha 5.\alpha 6$ (Hudson et al. 2003; Boutaud et al. 2000; Abreu-Velez und Howard 2012; Kashtan 2000) (**Abb. 1**).

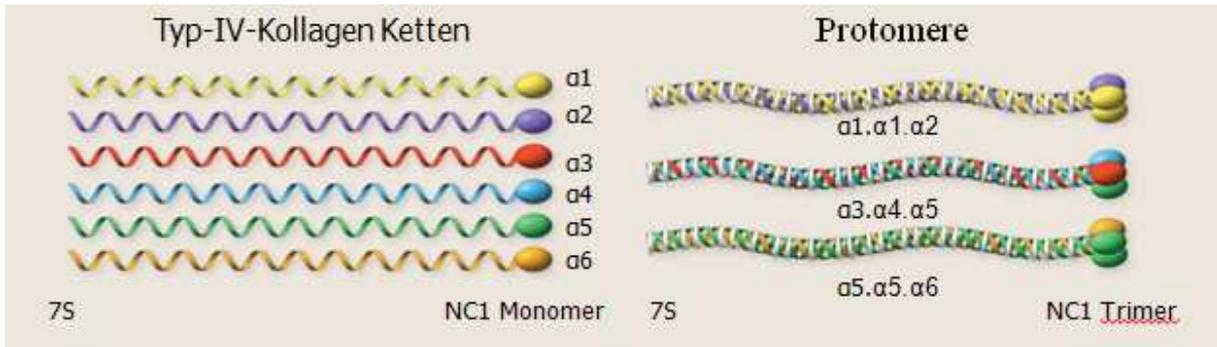


Abb. 1: Trippelhelix-Struktur der Typ-IV-Kollagen-Ketten

Jeweils drei α -Proteinketten fügen sich zu einer Trippelhelix zusammen. Diese Trippelhelices werden als Protomere bezeichnet [Abbildung modifiziert nach (Hudson et al. 2003)].

Die Protomere bilden selbstständig kompliziert aufgebaute Kollagen-Netzwerke: Zwei NC1-Trimer verschiedener Protomere fügen sich zu Hexameren zusammen, und vier 7S-Enden der Protomere bilden Tetramere (Hudson et al. 2003) (**Abb. 2**).

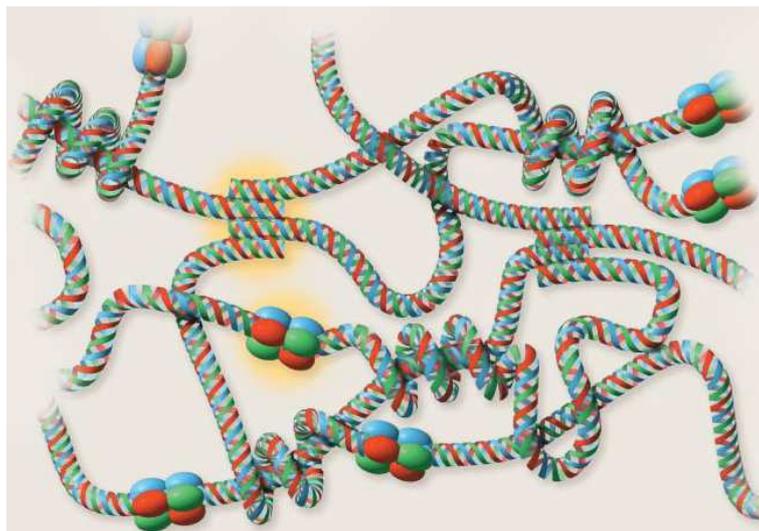


Abb. 2: Aufbau eines Kollagen-Typ-IV-Netzwerkes

Beispielhaft wird ein $\alpha 3, \alpha 4, \alpha 5$ -Netzwerk dargestellt. Jeweils zwei NC1-Trimer verschiedener Protomere und jeweils vier 7S-Enden verschiedener Protomere fügen sich zu einem kompliziert aufgebauten Netzwerk zusammen [Abbildung modifiziert nach (Hudson et al. 2003)].

Beim Alport-Syndrom führen Mutationen in den Genen *COL4A3*, *COL4A4* und *COL4A5* zu einer Fehlbildung des Typ-IV-Kollagens. Es kann sich daher kein korrektes $\alpha 3, \alpha 4, \alpha 5$ -Netzwerk ausbilden. Es kommt zu charakteristischen ultrastrukturellen Veränderungen der glomerulären Basalmembran (GBM) und zum progressiven Nierenversagen (Boutaud et al. 2000; Spear und Slusser 1972; Hinglais, Grünfeld und Bois 1972) (siehe 1.1.4).

1.1.3 Genetik

Für das Alport-Syndrom werden Mutationen in den Genen *COL4A3*, *COL4A4* und *COL4A5* verantwortlich gemacht. Diese Mutationen führen zu Strukturveränderungen in der α 3-, α 4- und α 5-Proteinkette des Typ-IV-Kollagens. Die Gene *COL4A3* und *COL4A4* befinden sich auf Chromosom 2 (2q36-q37). Das Gen *COL4A5* ist auf dem X-Chromosom lokalisiert (Xq22.3). In etwa 15% der Fälle wird die Erkrankung **autosomal-rezessiv** vererbt. Betroffen sind die Gene *COL4A3* und *COL4A4* und somit die Proteinketten α 3 und α 4. In etwa 5% der Fälle liegt ein **autosomal-dominanter** Erbgang vor. Auch hier sind die Gene *COL4A3* und *COL4A4* und somit die Proteinketten α 3 und α 4 betroffen. In etwa 80% der Fälle ist das Gen *COL4A5* und somit die Kollagen-Proteinkette α 5 betroffen (Kashtan 2000). In der Literatur werden beim X-chromosomalen Erbgang die Begriffe „X-chromosomal dominant“ (Jais et al. 2003), „X-chromosomal rezessiv“ (Wendler, Seidner, und Eysholdt 2005), „X-linked predominant“ (Ma et al. 2011) und „X-linked semidominant“ (Pescucci et al. 2004) verwendet. Meist wird jedoch von „**X-linked Alport-Syndrom**“ (XLAS) gesprochen. Diesem Beispiel wird auch in der vorliegenden Arbeit gefolgt. Frauen besitzen in jeder Zelle zwei X-Chromosomen, von denen laut Lyon-Hypothese eines inaktiviert wird. Die Inaktivierung erfolgt im Throphoblasten in jeder Zelle nach dem Zufallsprinzip. Mal wird also das X-Chromosom, das vom Vater vererbt wurde, inaktiviert, mal das von der Mutter. Dieses Inaktivierungsmuster wird dann an nachfolgende Tochterzellen weitergegeben. Somit weist jede Frau ein Mosaik klonaler Zellen auf, in dem entweder das vom Vater erhaltene X-Chromosom oder das von der Mutter vererbte X-Chromosom inaktiviert ist (Payer und Lee 2008). Ist eines der beiden X-Chromosomen durch eine Mutation verändert und liegt das unveränderte normale X-Chromosom im inaktivierten Zustand vor, kann es zu entsprechenden Funktionseinbußen kommen. Man spricht in diesem Fall von einer „ungünstigen X-Inaktivierung“. Dagegen mildern Zellen, in denen die normale Anlage aktiv ist und in der die veränderte Anlage inaktiviert worden ist, die Ausprägung der Erkrankung. Es können also auch Anlageträgerinnen erhebliche klinische Zeichen des Alport-Syndroms aufweisen (Thüroff, Stein und Beetz 2011). Bei den meisten Patienten mit XLAS lässt sich eine positive Familienanamnese feststellen. In 10-15% der Fälle handelt es sich um De-Novo-Mutationen (Kashtan 2009) (Jais et al. 2000).

1.1.4 Physiologie und Pathologie

Während der frühen embryonalen Entwicklung befindet sich im gesamten Glomerulus ein $\alpha1.\alpha1.\alpha2$ -Netzwerk. Im Laufe der fetalen Entwicklung wird dieses Netzwerk größtenteils durch stabilere $\alpha3.\alpha4.\alpha5$ - und $\alpha5.\alpha5.\alpha6$ -Netzwerke ersetzt. Es kommt zu einem sogenannten Switch. So ist im reifen Glomerulus das $\alpha1.\alpha1.\alpha2$ -Netzwerk nur noch Komponente der Bowman-Kapsel, der mesangialen Matrix und der Basalmembran. Beim XLAS findet aufgrund einer veränderten $\alpha5$ -Proteinkette dieser Switch gar nicht oder nur bedingt statt. Somit bleibt das instabilere $\alpha1.\alpha1.\alpha2$ -Netzwerk bestehen, und ggf. kommt es zu einem vollständigen Fehlen von $\alpha3.\alpha4.\alpha5$ - und $\alpha5.\alpha5.\alpha6$ -Netzwerken. Das embryonale $\alpha1.\alpha1.\alpha2$ -Netzwerk ist anfälliger für Endoproteolyse als das stärker vernetzte und somit stabilere $\alpha3.\alpha4.\alpha5$ -Netzwerk (Kalluri et al. 1997; Kalluri et al. 2000; Hudson et al. 2003). Dies führt im Verlauf zu Aufsplitterung der Lamina densa der glomerulären Basalmembran (GBM) in zahlreiche dünne Densalamellen. Später führt diese Aufsplitterung der Lamina densa, welche dann häufig fragmentiert und miteinander verwoben erscheint (retikuliert), zu einer Verdickung der GBM. Weiterhin kommt es zur Ausbildung einer segmentalen Sklerose und Verödung ganzer Glomeruli. Tubulusatrophie und interstitielle Fibrose mit spärlichen Entzündungsinfiltraten treten auf (Hopfer und Mihatsch 2010).

1.1.5 Klinik

Das Leitsymptom des Alport-Syndroms ist die Mikrohämaturie. Beim XLAS wird diese bei allen männlichen sowie bei 95,5% der weiblichen Anlageträger von Mutationen in *COL4A5* beobachtet (Jais et al. 2003, Jais et al. 2000). Auch eine makroskopisch sichtbare Hämaturie (Makrohämaturie) kann bei Alport-Patienten intermittierend auftreten. Diese taucht vor allem in der Kindheit auf (Kashtan et al. 2001). Insbesondere Infektionen (häufig der oberen Atemwege) können Episoden einer Makrohämaturie hervorrufen (Sessa und Meroni 2001). 62% der männlichen Patienten mit XLAS haben bereits einmalig oder wiederholt Episoden einer Makrohämaturie gehabt (Jais et al. 2000). Eine Hämaturie kann isoliert oder mit einer Proteinurie assoziiert vorkommen. 95% der Männer mit XLAS und 75% der Frauen mit XLAS weisen eine Proteinurie auf (Jais et al. 2003, Jais et al. 2000). Im Verlauf der Erkrankung verschlechtert sich die Nierenfunktion bis zu einer ESRD. Das Risiko

vor dem 40. Lebensjahr eine ESRD zu erleiden, liegt für Männer mit XLAS bei 90%, für Frauen mit XLAS bei 12% (Jais et al. 2003). 60-80% der Alport-Patienten leiden außerdem an einer bilateralen sensorineuralen Hörminderung (Gross, Koepke und Weber 2004). Im Patientenkollektiv von Jais et al. wiesen 28% der XLAS-Frauen und 79% der XLAS-Männer eine Schwerhörigkeit auf. Die Studie ergab, dass die Wahrscheinlichkeit, eine Schwerhörigkeit vor dem 40. Lebensjahr zu erleiden, für Männer mit XLAS bei 90% und für Frauen mit XLAS bei 10% liegt (Jais et al. 2003). Beim XLAS lässt sich die Hörminderung bei männlichen Patienten meist schon in Kindheit und im jungen Erwachsenenalter nachweisen. Es sind zunächst Frequenzen von 2000-8000Hz betroffen. Mit weiterem Fortschreiten der Erkrankung kommt es zu einem zunehmenden Hörverlust, und auch weitere Frequenzen können betroffen sein (Kashtan et al. 2001). Das Alport-Syndrom manifestiert sich in 25-40% der Fälle außerdem okulär (Gross, Koepke und Weber 2004). Bei Patienten mit XLAS konnten bei Frauen in 15% der Fälle und bei Männern in 35,2% der Fälle Augenveränderungen festgestellt werden. Meist waren es asymptotische Makulopathien („macular flecks“), selten auch Lentikonus anteriores (Jais et al. 2003). Auch laut Colville und Savige sind eine Dot-Fleck-Retinopathie und ein Lentikonus anterior für XLAS typisch (Colville und Savige 1997). Nur sehr selten werden andere okuläre Manifestationen beim XLAS nachgewiesen, wie beispielsweise der Keratokonus, die posteriore polymorphe korneale Dystrophie, die Mikrokornea, die Irisatrophie, der Katarakt, die spontane Linsenruptur, die Sphärophakie und der Lentikonus posterior. Gleiches gilt für das autosomal-rezessiv vererbte Alport-Syndrom. Beim seltenen autosomal-dominant vererbten Alport-Syndrom wurden bis dato lediglich Retinopathie und Katarakt beschrieben (Colville und Savige 1997). Arterielle Erkrankungen - insbesondere der Aorta - wie Aneurysmen und Dissektionen wurden bei einer kleinen Anzahl von männlichen Alport-Patienten geschildert (Kashtan et al. 2010; Lyons et al. 2007). Im Rahmen eines „contiguous gene deletion syndrome“ mit Deletion der Chromosomenregion Xq22.3 wird neben dem Alport-Syndrom eine geistige Retardierung, eine Mittelgesichtshypoplasie und eine Elliptozytose beobachtet (Vitelli et al. 1999). Das Alport-Syndrom kann außerdem mit einer Leiomyomatose assoziiert sein. Diese tritt auf, wenn die Deletion das 5'-Ende von *COL4A5* und *COL4A6* umfasst (Uliana et al. 2011). Die Leiomyomatose kann zu pulmonalen Komplikationen führen (Livnat et al. 2011).

1.1.6 Diagnostik

Zur Diagnosestellung eines Alport-Syndroms werden klinische, histopathologische und molekulargenetische Kriterien herangezogen.

1.1.6.1 Klinische Diagnosekriterien

Klinische Diagnosekriterien wurden schon 1988 durch Frances A. Flinter definiert (Flinter 1988). Heute zählt man zu den klinischen Diagnosekriterien die renalen Symptome, extrarenale Symptome (insbesondere Augenveränderungen und sensorineurale Hörminderung) sowie die Familienanamnese (Grünfeld 2000). Das Leitsymptom der Erkrankung ist hierbei die persistierende Mikrohämaturie. Proteinurie, Bluthochdruck und Niereninsuffizienz können zusätzlich beobachtet werden (Kashtan et al. 2001). Bei der Familienanamnese ist zu beachten, dass diese beim XLAS, sowie beim autosomal-rezessiv vererbten Alport-Syndrom bei erstgradig Verwandten unauffällig sein kann (Grünfeld 2000). Der bilaterale Lentikonus anterior stellt die für das Alport-Syndrom spezifische Augenveränderung dar (Xu et al. 2010). Auch die sensorineurale Hörminderung zählt zu den klinischen Diagnosekriterien. In jedem Fall sollte bei den Patienten eine Audiogramm-Untersuchung durchgeführt werden, da die Hörminderung vom Patienten anfänglich häufig nicht wahrgenommen wird (Thodi et al. 2006). Selten können auch andere Symptome wie Leiomyomatose, Aortenaneurysmen und geistige Retardierung auftreten (siehe 1.1.5) (Livnat et al. 2011; Lyons et al. 2007; Vitelli et al. 1999). Jais et al. zählen die diffuse, ösophageale Leiomyomatose bereits zu den neuen Diagnosekriterien (Jais et al. 2000).

1.1.6.2 Histologische und immunhistologische Diagnostik

Zur Diagnostik des Alport-Syndroms wird bisher meist eine Nierenbiopsie durchgeführt. Eine lichtmikroskopische Untersuchung ist häufig im Anfangsstadium nicht aussagekräftig. Bei Kindern, die sich noch im Frühstadium der Erkrankung befinden, liegt meist ein unauffälliger lichtmikroskopischer Befund vor. Auch bei Erwachsenen sind die Auffälligkeiten recht unspezifisch (Flinter 1997). Zu den Auffälligkeiten beim Alport-Syndrom zählen die tubulointerstitiellen Schaumzellen und Glomerula mit hypertrophen Podozyten. Daneben kommen Mesangiumverbreiterung und eine Ver-

dickung der glomerulären Basalmembran vor. Des Weiteren können eine segmentale Sklerose, Tubulusatrophien und interstitielle Fibrosen mit spärlichen Entzündungsinfiltraten auftreten (Hopfer und Mihatsch 2010). Eine elektronenmikroskopische Untersuchung bleibt unerlässlich, auch wenn diese allein nur eingeschränkt zur Diagnostik beitragen kann. Auch mit dieser kann nicht in allen Fällen ein Alport-Syndrom von dem Syndrom der dünnen Basalmembran (TBMN, Thin Glomerular Basement Membrane Nephropathy) unterschieden werden. Zur Differentialdiagnostik ist in diesen Fällen zusätzlich zur elektronenmikroskopischen Untersuchung eine immunhistologische Untersuchung einer Nieren- oder Hautbiopsie notwendig (Haas 2009). Im elektronenmikroskopischen Bild erscheint beim Alport-Syndrom die Lamina densa der GBM aufgesplittert, fragmentiert und retikuliert. Es herrscht ein dichtes Nebeneinander von dünnen und dicken glomerulären Basalmembran-Abschnitten. Des Weiteren kommen kleine polymorphe Densapartikel (wahrscheinlich Abbauprodukte) zwischen den Densalamellen vor. Podozyten erscheinen vergrößert und enthalten häufig Vakuolen. Auch finden sich zusätzlich kleinste knöpfchenartige Protrusionen an der Außenseite der GBM unter den Podozyten. Die podozytären Fußfortsätze sind fusioniert. Häufig fällt auch hier eine Vermehrung des Mesangiums auf (Hopfer und Mihatsch 2010; Noel 2000) (**Abb. 3**).

Eine definitive Diagnosestellung wird in den meisten Fällen durch Kombination einer elektronenmikroskopischen Untersuchung mit einer immunhistologischen Untersuchung erzielt (Haas 2009). Bei männlichen XLAS-Patienten fehlt in der Nierenbiopsie typischerweise die Immunfärbung für die $\alpha 3$ -, $\alpha 4$ - und $\alpha 5$ -Kette des Typ-IV-Kollagens. Nur in etwa 20% der Fälle kommt es zu einer normalen Anfärbung der Basalmembran für die $\alpha 3$ -, $\alpha 4$ - und $\alpha 5$ -Kette des Typ-IV-Kollagens. Bei XLAS-Frauen kann eine partielle Anfärbung der genannten Proteinketten beobachtet werden (Kashtan, Kleppel und Gubler 1996). Bei Patienten, die am autosomal-rezessiv vererbten Alport-Syndrom leiden, fehlt ebenfalls in der Immunhistologie in der GBM die Anfärbung für die $\alpha 3$ -, $\alpha 4$ - und $\alpha 5$ -Proteinketten des Typ-IV-Kollagens. Zu beachten ist aber, dass bei diesen Patienten in der extraglomerulären Basalmembran, wie die der Bowman Kapsel, der Sammelrohre und der Epidermis, die $\alpha 5$ -Proteinkette durch immunhistologische Anfärbung nachgewiesen werden kann (Gubler et al. 1995). Auch Jais et al. zählen eine abnorme Verteilung der $\alpha 3$ -, $\alpha 4$ - und $\alpha 5$ -Kette des Typ-IV-Kollagens in der GBM bereits zu den neuen Diagnosekriterien des Alport-Syndroms (Jais et al. 2000).

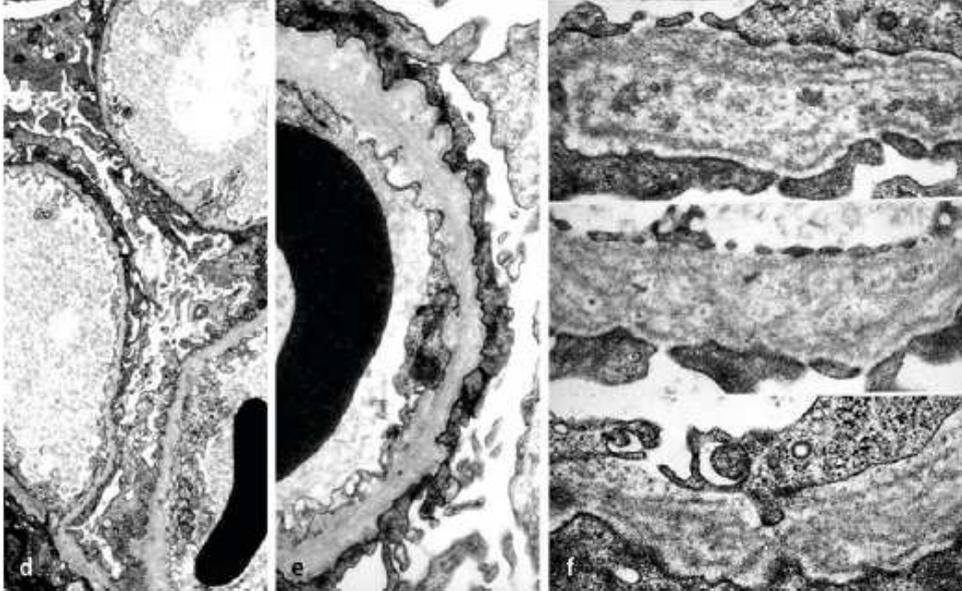


Abb. 3: Elektronenmikroskopischer Befund bei Alport-Syndrom

d) Verdünnung und Verdickung der GBM; e) Verdickte Basalmembran mit fusionierten Podozytenfortsätzen; f) Lamellierung, Fragmentierung und Retikulierung der GBM [Abbildung modifiziert nach (Hopfer und Mihatsch 2010)]

1.1.6.3 Molekulargenetische Diagnostik

Eine weitere nicht-invasive Möglichkeit, ein Alport-Syndrom zu diagnostizieren, bietet die molekulargenetische Untersuchung. Untersucht werden die Gene *COL4A3*, *COL4A4* und *COL4A5*. Die Entwicklung prädiktiver genetischer Tests wird durch die Tatsache erschwert, dass sich die Mutationen beim Alport-Syndrom nicht nur auf wenige Regionen der Gene *COL4A3*, *COL4A4* und *COL4A5* beschränken. Vielmehr verteilen sie sich über viele Exons (Hudson et al. 2003). Die Mutationen reichen von Punktmutationen bis zu Deletionen ganzer Regionen (Bekheirnia et al. 2010). Allein im *COL4A5*-Gen sind in der Literatur mittlerweile über 600 Mutationen beschrieben:

[„ARUP Scientific Resource for Research and Education: ALPORT Database, University of Utah“; zuletzt aufgerufen am 07.07.2014: http://www.arup.utah.edu/database/ALPORT/ALPORT_display.php].

[“HGMD-Professional; BIOBASE Biological Databases“; zuletzt aufgerufen am 07.07.2014: <https://portal.biobase-international.com/hgmd/pro/gene.php?gene=COL4A5>]

Autosomal-rezessiv vererbtes Alport-Syndrom sollte vor allem dann in Betracht gezogen werden, wenn eines der folgenden Kriterien gilt: Konsanguinität, Mikrohämaturie beider Elternteile und/oder immunhistologischer Nachweis der $\alpha 5$ -Proteinkette des Typ-IV-Kollagens in der epidermalen Basalmembran (Grünfeld 2000).

1.1.7 Differentialdiagnosen

Für gewöhnlich tritt bei Alport-Patienten schon in der Kindheit eine Mikrohämaturie auf. Wird diese bei einem Patienten festgestellt, sollte zunächst abgeklärt werden, ob die Hämaturie auf einer glomerulären oder einer nicht-glomerulären Ursache beruht. Um die Ursachen der Hämaturie weiter einschränken zu können, werden die Erythrozyten des Urinsediments morphologisch unter dem Phasenkontrastmikroskop untersucht. Des Weiteren sollte die Urin-Kalzium-Konzentration gemessen werden und eine Ultraschalluntersuchung der Nieren und ableitenden Harnwege erfolgen. Eine nicht-glomeruläre Ursache für die Mikrohämaturie schließt ein Alport-Syndrom aus. Als weiteres diagnostisches Kriterium spielt die Familienanamnese eine wichtige Rolle. Wurde eine glomeruläre Ursache für die Hämaturie beim Kind festgestellt und die Familienanamnese ist unauffällig, sind die wahrscheinlichsten Diagnosen die IgA-Nephritis, die TBMN, das Alport-Syndrom und membranproliferative Glomerulopathien. Bei Kindern mit einer positiven Familienanamnese beschränkt sich die Möglichkeit an Diagnosen auf die TBMN und das Alport-Syndrom, obwohl auch die IgA-Nephropathie gelegentlich familiär gehäuft auftritt (Kashtan et al. 2001). Andere Erbkrankheiten, die sich ebenfalls glomerulär manifestieren und mit einer sensorineuralen Hörminderung einhergehen, sollten ebenfalls in Betracht gezogen werden. Beispielsweise können Mutationen in mitochondrialer tRNA ein Alport-Syndrom imitieren. Auch hierbei kommt es zu einer progressiven Niereninsuffizienz assoziiert mit einer Schwerhörigkeit (Jansen et al. 1997). Eine weitere Differentialdiagnose stellt das Fechtner-Syndrom dar. Das Fechtner-Syndrom gehört, wie die May-Hegglin-Anomalie, das Sebastian- und das Epstein-Syndrom, zu den Erkrankungen, die durch Mutationen im *MYH9*-Gen hervorgerufen werden. Das *MYH9*-Gen kodiert für die schwere Kette des nicht-muskulären Myosins. Neben Symptomen des Alport-Syndroms (Glomerulonephritis, sensorineurale Hörminderung und Katarakt) tritt eine Makrothrombozytopenie auf. Zusätzlich können Einschlusskörperchen in den Leukozyten nachgewiesen werden (Heath et al. 2001).

1.1.8 Therapie

Für das autosomale Alport-Syndrom gibt es *COL4A3* *-/-* Knockout-Mäuse. Der Phänotyp dieser Mäuse ist gekennzeichnet durch eine progressive Glomerulo-

nephritis, eine Mikrohämaturie und eine Proteinurie. Die Mäuse entwickeln im Durchschnitt im Alter von 14 Wochen eine terminale Niereninsuffizienz. Wie beim humanen Alport-Syndrom kann mit dem Elektronenmikroskop eine Verdickung und Verdünnung der glomerulären Basalmembran beobachtet werden. Nach 14 Wochen ist etwa die Hälfte der Glomeruli fibrotisch (Cosgrove et al. 1996). An diesem Maus-Modell konnte nachgewiesen werden, dass eine präventive Therapie mit dem Angiotensin-Converting-Enzyme-Inhibitor (ACE-Inhibitor/Hemmer) Ramipril eine Niereninsuffizienz verzögert und eine renale Fibrose sowie eine Proteinurie vermindert. Dies wird über die Downregulierung von TGF β 1 gesteuert. Im Rahmen dieser Studie konnte gezeigt werden, dass die unbehandelten Mäuse nach 71 \pm 6 Tage sterben. Das Überleben der Mäuse, die ab der vierten Woche mit Ramipril behandelt wurden, verlängerte sich um 111% auf 150 \pm 21 Tage ($p < 0,01$) (Gross et al. 2003). Anstatt einem ACE-Hemmer kann zur Therapie des Alport-Syndroms auch ein Angiotensinrezeptor-Blocker (AT1-Antagonisten) verwendet werden. Der AT1-Antagonist Candesartan verlängert das Überleben der *COL4A3* $-/-$ Knockout-Mäuse um 38% auf 98 \pm 16 Tage. Ramipril behindert jedoch im Gegensatz zu Candesartan die proinflammatorische, profibrotische Aktivierung des Angiotensin-2-Rezeptors (Gross et al. 2004). Eine Behandlung der Mäuse mit dem HMG-CoA-Reduktase-Inhibitor Cervalstatin verlängert das Überleben der Mäuse nur um 28% auf 91 \pm 9 Tage. Die Hemmung der Nierenfibrosierung ist daher ein zusätzlicher nephroprotektiver Effekt, der besonders durch ACE-Hemmer bewirkt wird und diese damit von anderen Antihypertensiva unterscheiden (Koepke et al. 2007).

Aufgrund der Ergebnisse am Mausmodell empfehlen Gross, Koepke und Weber bereits 2004 bei Kindern mit Alport-Syndrom die hochdosierte Therapie mit Ramipril ab dem Grundschulalter. Nur wenn aufgrund von Nebenwirkungen eine Therapie mit Ramipril nicht durchgeführt werden kann, sollte auf einen AT1-Antagonisten umgestellt werden. Eventuell kann die zusätzliche Gabe eines Statins in Erwägung gezogen werden, wenn eine große Proteinurie mit Dyslipoproteinämie besteht (Gross, Koepke und Weber 2004). Inwieweit der ACE-Inhibitor Ramipril im Vergleich zu einem Placebo bei frühen Stadien des Alport-Syndroms beim Menschen wirkt und wann genau mit einer Ramipril-Therapie begonnen werden sollte, wird derzeit noch von Gross et al. in der prospektiven, randomisierten Studie „Early Pro-TECT“ untersucht: [(http://www.alport.de/EARLY_PRO-TECT.html zuletzt aufgerufen am 07.07.14)]

Im Rahmen einer terminalen Niereninsuffizienz muss ein Nierenersatz-Verfahren in Form einer Dialyse eingeleitet werden. In Europa sind 0,6% der Patienten, die eine Nierenersatz-Therapie benötigen, Alport-Patienten (Flinter 1997). Auch Nierentransplantationen sind in der Regel erfolgreich bei Alport-Patienten (Kashtan 2000). Eine Anti-GBM-Nephritis der Transplantatniere ist eine seltene, aber schwerwiegende Komplikation nach Transplantation. Sie wird bei 3% der männlichen Alport-Patienten, bei denen eine Transplantation durchgeführt wird, beobachtet (Byrne et al. 2002). Kommt es bei einem Alport-Patienten zu Schwerhörigkeit, sollte eine Hörgeräteversorgung erfolgen. Bei okulärer Manifestation der Erkrankung sollte ophthalmologisch interveniert werden. Eventuell ist eine Extraktion der Linse sinnvoll (Gupta et al. 2011).

1.1.9 Stand der Forschung

In den letzten Jahren hat unser Wissen über den Pathomechanismus beim Alport-Syndrom stark zugenommen. Ursprünglich ist man aufgrund der tubulointerstitiellen Schaumzellen davon ausgegangen, dass es sich beim Alport-Syndrom um eine tubulointerstitielle Erkrankung handelt. Heute weiß man, dass die veränderte GBM des Alport-Patienten dem hydrostatischen Druck nicht mehr standhalten kann. Es kommt somit zu einem pathologischen Verlust von Proteinen. Derzeit stützt sich die Behandlung von Alport-Patienten vor allem auf eine Blockade des RAAS (Renin-Angiotensin-Aldosteron-System). Es wird erforscht, inwieweit andere Therapiemöglichkeiten, die an Inflammation und Fibrose angreifen, eine Progression vermindern können. Diskutiert werden beispielsweise Komplement-Inhibitoren und Chemokin-Rezeptorantagonisten (Noone und Licht 2012). Außerdem werden Möglichkeiten einer Gentherapie bei Alport-Patienten erforscht. Sie stoßen in erster Linie auf technische Grenzen bei der Einbringung der Genfähren (Heikkila et al. 1996). In ferner Zukunft könnte auch eine Stammzelltherapie Heilung versprechen. Am Mausmodell konnte bereits nachgewiesen werden, dass Knochenmarkszellen zur Regeneration von Podozyten beitragen und eine Verbesserung von Nierenerkrankungen bewirken (Prodromidi et al. 2006).

1.2 Ziel der Arbeit

In der Vergangenheit ging man davon aus, dass Mädchen und Frauen mit Alport-Syndrom, keine oder nur geringe Symptome der Erkrankung aufweisen. Bisher gibt es nur eine Studie zur Genotyp-Phänotyp-Korrelation bei Frauen mit XLAS und zwei Studien bei männlichen Patienten mit XLAS (Gross et al. 2002, Jais et al. 2000 und Jais et al. 2003). Jais et al. konnten bei männlichen XLAS-Patienten für die Ausbildung einer ESRD und einer Schwerhörigkeit eine Abhängigkeit von Mutationen feststellen, bei den weiblichen XLAS-Patienten ließ sich die Genotyp-Phänotyp-Korrelation leider nicht bestätigen (Jais et al. 2000 und 2003). Neuere Ergebnisse deuten außerdem darauf hin, dass nicht nur die Art der Mutation, sondern auch die Lokalisation im Gen, einen Einfluss auf die klinische Ausprägung der Erkrankung hat. Inwieweit dies auch für Patienten mit Mutationen in *COL4A3* und *COL4A4* gilt, wurde bisher noch nicht untersucht. Nichtsdestotrotz haben Jais et al. festgestellt, dass 95% der Patientinnen eine Hämaturie, 75% eine Proteinurie jeweils unbekanntes Ausmaßes, 28% eine Schwerhörigkeit und 15% Augenveränderungen aufweisen (Jais et al. 2003). Bisher ist jedoch unklar, ob und wie häufig vorangegangene beschriebene Symptome isoliert auftreten. Interessant wäre außerdem herauszufinden, ob auch bezüglich isolierter Symptome eine Genotyp-Phänotyp-Korrelation besteht.

In der vorliegenden Studie sollen Alport-Patientinnen und Alport-Patienten zuerst molekulargenetisch untersucht werden. Zunächst wird die Detektionsrate für Mutationen bestimmt. Es soll veranschaulicht werden, welche Mutationen bei den untersuchten Patienten nachweisbar sind. Im Rahmen der Mutationsanalyse soll der Anteil bisher unbekannter, in der Literatur noch nicht beschriebener Mutationen ermittelt werden. Die klinische Ausprägung des Alport-Syndroms bei den Patienten wird mit Hilfe eines Fragebogens abgefragt. Es soll untersucht werden, wie sich diese bei männlichen und weiblichen Alport-Patienten voneinander unterscheidet. Des Weiteren soll herausgefunden werden, ob und wie häufig Symptome isoliert auftreten. Ziel der Arbeit ist es, eine mögliche Genotyp-Phänotyp-Korrelation nachzuweisen, und zwar auch im Hinblick auf isoliert auftretende Symptome. So soll erforscht werden, ob bestimmte Mutationen die Penetranz der Erkrankung beeinflussen.

2 Patienten, Methoden und Materialien

2.1 Patienten

Diese wissenschaftliche Arbeit über die Genotyp-Phänotyp-Korrelation bei Alport-Patienten und Alport-Patientinnen wurde in der Kinderklinik und Kinderpoliklinik im Dr. von Haunerschen Kinderspital in München in Zusammenarbeit mit dem Zentrum für Humangenetik und Laboratoriumsmedizin Dr. Klein, Dr. Rost und Kollegen in Martinsried durchgeführt. Das Forschungsvorhaben zur Untersuchung einer Genotyp-Phänotyp-Korrelation bei Alport-Patientinnen und Alport-Patienten wurde von der Ethikkommission der Ludwig-Maximilians-Universität München geprüft und genehmigt. Alle Patienten wurden über das Forschungsziel aufgeklärt und haben ihr Einverständnis zur Erhebung und Speicherung der Daten nach dem Datenschutzgesetz für 10 Jahre gegeben. Die Patienten waren außerdem mit einer Auswertung und Veröffentlichung der Daten in pseudonymisierter Form einverstanden. Insgesamt standen 87 Patienten für eine molekulargenetische Untersuchung zur Verfügung. In das Patientenkollektiv eingeschlossen wurden die Patienten, bei denen genetische Mutationen in einem der Gene *COL4A3*, *COL4A4* oder *COL4A5* nachgewiesen worden sind und von denen vollständige Angaben zum Verlauf der Erkrankung anhand eines Fragebogens ermittelt werden konnten. Von der Studie ausgeschlossen wurden die Patienten, bei denen keine genetischen Mutationen in den benannten Genen nachgewiesen werden konnten und diejenigen, von denen keine Angaben bzw. unzureichende Angaben zur Ausprägung der Erkrankung zur Verfügung standen.

2.2 Methoden

2.2.1 Allgemeine Vorgehensweise

Nach Einwilligung des Patienten wurde von diesem 2-3ml EDTA-Blut (Ethyldiamintetraacetat) gewonnen. Daraufhin wurde zunächst Desoxyribonukleinsäure (DNA, deoxyribonucleic acid) aus den Lymphozyten des Blutes isoliert. Nachdem die Konzentration und Reinheit der isolierten DNA mit Hilfe eines Photometers bestimmt wurden, wurde das zu untersuchende DNA-Fragment nach dem Prinzip der Polymerase-

kettenreaktion (PCR) amplifiziert. Eine Kontrolle über die erfolgreiche Amplifikation des gewünschten DNA-Fragments fand mit der Agarose-Gel-Elektrophorese statt. Anschließend wurden die PCR-Produkte in einer Mikrotiterplatte aufgereinigt. Daraufhin erfolgte eine Sequenzierreaktion, bei der die Reaktion für den Forward- und Reverse-Strang in getrennten Wells angesetzt wurde, mit anschließender Fällung und Färbung mit Formamid. Nun konnte eine DNA-Sequenzanalyse durchgeführt und diese ausgewertet werden.

Die klinische Ausprägung der Erkrankung wurde anhand eines Fragebogens abgefragt. Daraufhin wurde untersucht, ob eine potenzielle Korrelation zu genetischen Mutationen besteht.

2.2.2 Extraktion der Nukleinsäure

2.2.2.1 Manuelle DNA-Isolierung

Die manuelle DNA-Isolierung wurde mit dem *Genra Puregene DNA Purification Kit* von *Qiagen* durchgeführt. Ziel der DNA-Isolierung ist es, möglichst reine DNA aus einer Probe zu gewinnen. Hierzu werden zunächst die kernlosen Erythrozyten lysiert. Die kernhaltigen Zellen werden daraufhin aus dem Lysat abzentrifugiert. Diese werden dann ebenfalls lysiert, um die DNA frei zugänglich zu machen. Nach dem Abzentrifugieren wird die DNA aus dem Überstand gefällt. Es wurde laut Herstelleranweisung vorgegangen:

Lyse der Erythrozyten:

Eine Probe von 450µl Blut wird in einem Präparationsgefäß mit 1350µl *Red Blood Cell Lysis Solution (RBC Lysis Solution)* vermischt. Das Gemisch wird bei Raumtemperatur 5 Minuten im Rotator inkubiert. Nach dem Zentrifugieren (30 Sekunden bei 16000G/min) wird das weiße Pellet, bestehend aus kernhaltigen Zellen, am Boden sichtbar. Der Überstand wird dekantiert. Das Restvolumen wird mit Hilfe eines Vortexers gut vermischt, bis kein Pellet mehr sichtbar ist.

Lyse der kernhaltigen Zellen:

Nun werden 450µl *Cell Lysis Solution* und 2µl *Proteinase K* hinzugegeben und vermischt, um die kernhaltigen Zellen zu lysieren, die Proteine abzubauen und somit eine Freisetzung von Nukleinsäuren zu gewährleisten. Zunächst wird die Probe bei 55°C auf dem Heizblock inkubiert, daraufhin abzentrifugiert, um diese dann erneut auf dem Kühlblock zu inkubieren, bis ein vollständiges Lösen der Zellen erreicht ist.

Fällung:

Zur Probe wird 150µl *Protein Precipitation Solution* hinzugegeben und auf dem Vortexer 20 Sekunden kräftig vermischt. Dann wird die Probe zentrifugiert (1 Minute bei 16000G/min), bis ein festes, braunes Pellet am Gefäßboden zu sehen ist. Im Überstand befindet sich die DNA. Der Überstand der Probe wird in einem neuen Gefäß mit 450µl 100%iges *Isopropanol* und 0,5µl *Glycogen Solution* vermischt. Isopropanol dient der Präzipitation (Fällung) der DNA. Die *Glycogen Solution* erhöht die DNA-Ausbeute. Nachdem das Gemisch 5 Minuten bei 15 Umdrehungen pro Minute auf dem Rotator gedreht wurde, ist die ausgefällte DNA als weißer Faden zu sehen. Nach weiterem Zentrifugieren (1 Minute bei 16000G/min) wird die DNA als kleines, weißes Pellet sichtbar. Der Überstand wird verworfen. Nun wird 450µl 70%iges *Ethanol* zu der DNA hinzugemischt und ein weiteres Mal zentrifugiert (1 Minute bei 16000G/min), um die DNA zu pelletieren. Der Überstand wird wieder verworfen. Zum Pellet wird 50µl *DNA Hydration Solution* hinzugegeben und durch vorsichtiges Anschneiden das Pellet gelöst. Damit sich die DNA vollständig löst, wird die Probe 60 Minuten bei 65°C im Hybridisierungssofen inkubiert. Zum weiteren Lösen lässt man die DNA bei Raumtemperatur über Nacht stehen.

2.2.2.2 Automatisierte DNA-Isolierung

Als Alternative zur manuellen DNA-Isolierung mit dem *Gentra Puregene DNA Purification Kit* von *QIAGEN* kann DNA auch mit einem automatisierten System gewonnen werden. Hier wurde der *Hamilton Chemagic STAR* verwendet. Beim *Hamilton Chemagic STAR* wird die Nukleinsäure an sogenannte magnetische *beads* gebunden (**Abb. 4**).



Abb. 4: Hamilton Chemagic STAR
Automatisiertes System zur Gewinnung von Nukleinsäure

Zunächst wird, wie bei der manuellen DNA-Isolierung, die DNA durch Lyse freigesetzt. Magnetische kleine Kügelchen, die sogenannten *beads*, werden zur Probe hinzugefügt. Diese sind so beschaffen, dass sie DNA effizient binden. Ein starker Elektromagnet magnetisiert eine Stahlnadel, die - zum Schutz vor Kontamination von einer Plastikhülle umkleidet - in das Gefäß eintaucht. Die magnetisierte Nadel zieht die magnetischen *beads* mit den gebundenen Nukleinsäuren an. Bei der folgenden Aufreinigung, die mit speziellen Puffern erreicht wird, wird die DNA weiterhin von der magnetischen Nadel festgehalten. Erst nach Aufreinigung wird der elektrische Magnet ausgeschaltet, und die Nadel beginnt zu rotieren. Dies unterstützt ein vollständiges Mischen der Partikel in Lösung (**Abb. 5**). Nun wird ein Elutionspuffer hinzugefügt, der die DNA von den *beads* ablöst. Die DNA kann nun in Auffanggefäßen gesammelt werden.

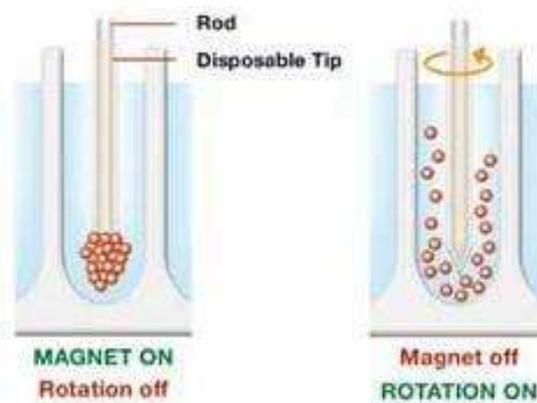


Abb. 5: Auswirkung der Magnetisierung und Rotierung der Nadel auf die *beads* im Hamilton Chemagic STAR

2.2.3 Vermessung der Konzentration und Reinheit der DNA

Zur Vermessung der Konzentration und Reinheit der DNA wurde ein *NanoDrop 1000 Spektralphotometer* verwendet. Beim *NanoDrop 1000* handelt es sich um ein Spektralphotometer, mit dessen Hilfe die Konzentration von Nukleinsäure in sehr kleinen Volumina (1-2µl) bestimmt werden kann. Dies erfolgt durch Messung der Extinktion bei einer Wellenlänge von 260nm (=OD260). Die Extinktion entspricht dem Absorptionsmaximum. Das Licht wird durch die aromatischen Ringe der Basen absorbiert. Für doppelsträngige DNA gilt, dass ein gemessener OD-Wert von 1 bei einer Wellenlänge von 260nm einer Konzentration von etwa 50µg/ml entspricht. Per Dreisatz kann also die Konzentration der DNA bestimmt werden:

$$\text{DNA } [\mu\text{g/ml}] = \text{gemessene OD260 } [\mu\text{g/ml}] \times 50 \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

Um die Reinheit der DNA zu bestimmen, wird die Extinktion bei 260nm und bei 280nm bestimmt. Das Verhältnis dieser beiden Werte OD260/OD280 stellt den sogenannten Extinktionskoeffizienten dar und sollte zwischen 1,8 und 2,0 liegen. Werte, die über diesem Sollbereich liegen, weisen auf ein Vorhandensein von RNA hin. Werte, die kleiner als 1,8 sind, deuten auf eine Verunreinigung mit Protein hin (Thiemann, Cullen und Klein 2006).

2.2.4 Amplifikation der Nukleinsäure

2.2.4.1 Die Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) dient dazu, ein definiertes DNA-Fragment *in vitro* enzymatisch zu amplifizieren, das heißt zu vervielfältigen. Ausgangspunkt kann geringste Menge an DNA sein. Dieses Startmaterial wird als *Template* bezeichnet. Benötigt werden ein Primerpaar, eine hitzestabile DNA-Polymerase sowie die Bausteine der DNA, die Nukleotide. Primer sind Oligonukleotide, die der DNA-Polymerase als Startpunkt für die DNA-Replikation dienen. Das zu amplifizierende DNA-Fragment liegt zwischen zwei Regionen bekannter Basensequenzen. Künstlich hergestellte Primer sind diesen Basensequenzen komplementär. Bei der PCR wird ein Zyklus, der aus drei Schritten besteht, ungefähr 20- bis 30-mal wiederholt. In jedem

Zyklus wird die Probe zunächst auf 95°C erhitzt. Hierdurch werden die Wasserstoffbrückenbindungen, die die beiden Stränge des Doppelstrangs der DNA zusammenhalten, gelöst. Das Ergebnis sind zwei voneinander getrennte Einzelstränge. Man spricht bei dieser ersten Phase eines Zyklus von *Denaturierungsphase*. Als nächstes wird die Temperatur auf 50-60°C abgesenkt, sodass sich die Primer an die Einzelstränge anlagern können. Dieser zweite Schritt wird auch als *Annealing* bezeichnet. Beim dritten Schritt handelt es sich um die *Elongation*, das heißt die DNA-Polymerase synthetisiert das DNA-Fragment. Die DNA-Polymerase erkennt die Primer, dockt an diese an und ergänzt die Einzelstränge mit Hilfe der freien Nukleotide in Richtung 5'→3' komplementär wieder zu Doppelsträngen. Die Temperatur dieses Schrittes liegt üblicherweise zwischen 68°C und 72°C und ist von der Art der DNA-Polymerase abhängig. Ergebnis eines Zyklus ist also die Verdopplung des *Templates*. Das Produkt dient dem nächsten Zyklus als *Template*. Es kommt demnach zu einer exponentiellen Vervielfältigung der Ausgangs-DNA (Thiemann, Cullen und Klein 2006).

2.2.4.2 Ablauf der Polymerasekettenreaktion

Als Ansatz wird der sogenannte Mastermix von 30µl verwendet, der aus folgenden Komponenten besteht:

- 1,2µl Primer Mix (besteht aus Primer forward und Primer reverse): *An den Primern ist eine M13-Universal-Primersequenz angehängt, die sich letztendlich an allen PCR-Produkten befindet. So kann später für die Sequenzierreaktion mit diesem M13-Primer gearbeitet werden*
 - *M13 forward primer sequence: 5'-d(GTTTTCCCAGTCACGAC)-3'*
 - *M13 reverse primer sequence: 5'-d(CAGGAAACAGCTATGAC)-3'*
- 17,3µl steriles Wasser
- 3,0µl 10xPCR-Puffer
- 3,0µl dNTP (2mM)
- 1,8µl MgCl₂ (25mM): *wird für die Taq-Polymerase zum Einbau von dNTPs benötigt*
- 1,5µl DMSO (Dimethylsulfoxid): *erhöht die Ausbeute an PCR-Produkten*
- 0,2µl Taq-Polymerase [5U/µl]
- 2,0µl DNA-Template

Die Bestandteile des Mastermixes werden in ein Reaktionsgefäß auf Eis pipettiert. Dann wird der Mastermix für 5-10 Sekunden gevortext. Im Thermocycler wird folgendes Programm gestartet:

Anzahl der Zyklen	Temperatur		Zeit
	95°C		4:00 Min.
10 Zyklen	94°C		0:30 Min.
	Touchdown	65-55°C	0:30 Min.
	72°C		0:15 Min.
30 Zyklen	94°C		0:30 Min.
	58°C		0:30 Min.
	72°C		0:15 Min.
	72°C		3:00 Min.

Das Reaktionsgefäß wird erst nach einer Vorheizphase (ab 85°C) in den Thermocycler gestellt. Das Hineinstellen des Reaktionsgefäßes bei Erreichen der Denaturierungstemperatur in den Thermocycler verhindert eine unspezifische Hybridisierung der Primer beim langsamen Erwärmen. Bei den ersten zehn Reaktionszyklen wird das Touchdown-Programm verwendet. Dies bedeutet, dass die Annealing-Temperatur bei jedem Durchgang um ein Grad Celsius sinkt. Dadurch wird eine höhere Spezifität der PCR erreicht.

2.2.5 Detektion der PCR-Produkte: Agarosegelelektrophorese und Gelfärbung mit Ethidiumbromid

Bei der Agarosegelelektrophorese wird die DNA in einer Kammer in ein Agarosegel aufgetragen. Diese Kammer wird an ein Hochspannungsgerät angeschlossen. Da die DNA negative Ladungen trägt, wandert sie zum positiven Pol. Das Agarosegel besteht aus einem komplexen Netzwerk von Poren, durch welche die DNA-Moleküle der Größe nach aufgetrennt werden.

Zunächst wird ein 2,7%iges Agarosegel in einer Elektrophoresekammer hergestellt. Hierzu wird 1,8g des Agarosepulvers abgewogen. Die Agarose wird in 100ml 1xTBE-Puffer (Tris-Hydroxymethyl-Aminomethan-Borat-EDTA-Puffer) suspendiert. Sie wird erhitzt, bis sie vollständig gelöst ist und die Lösung klar ist. Das Gel sollte nun luftblasenfrei in die Kammer gegossen werden. Sofort werden die Kämme in das

flüssige Gel eingehängt. Nachdem das Gel fest geworden ist, wird der Gelträger in die Elektrophoresekammer gelegt und die Kämme entfernt. Die Kämme haben nun kleine Taschen im Gel gebildet, in die später die DNA eingefügt wird. Nun wird 1µl *Loading Dye* in einer Platte vorgelegt. *Loading Dye* enthält Bromphenolblau zum Färben der DNA und hat außerdem die Funktion, die DNA zu erschweren, damit diese später in den Taschen absinkt und nicht an die Oberfläche diffundiert. Zum *Loading Dye* wird 3µl PCR-Produkt hinzupipettiert. In die erste Spur des Gels wird 1,5µl der 100-bp-Leiter-DNA als Vergleichsmarker angesetzt. 3µl der Produkt-*Loa-ding-Dye*-Mischung wird auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgt bei 230V für 30 Minuten. Die DNA-Moleküle werden nun der Größe nach aufgetrennt. Um die PCR-Fragmente nach erfolgter Agarosegelelektrophorese darstellen zu können, wird das Agarosegel in einer wässrigen Ethidiumbromidlösung inkubiert (für ca. 5 Minuten). Danach kann das Gel unter UV-Licht fotografiert werden. Hierzu wird das *Molecular Imager Gel Doc XR* System mit der zugehörigen *Lab 2.0* Software verwendet.

2.2.6 Aufreinigung der PCR-Produkte

Durch die Aufreinigung sollen die in der PCR-Reaktion entstandenen PCR-Produkte von Rückständen (Primer, Nukleotide, Salze und Polymerase etc.) befreit werden. Es werden *MultiScreen PCR-96-well Platten* von *Millipore* verwendet. Die Aufreinigungsplatte wird mit den gewünschten PCR-Produkten zusammengestellt. Die PCR-Produkte werden abzentrifugiert. Die Aufreinigungsplatte wird auf ein Vakuummanifold gestellt. Zu allen PCR-Tubes wird 190µl HPLC-Wasser hinzupipettiert und gemischt. Das gesamte Volumen wird in die Aufreinigungsplatte übertragen, welche dann mit einem Deckel abgedeckt wird. Bei 10 mmHg Vakuum lässt man die Produkte auf die Membran binden (5 bis maximal 15 Minuten). Die Aufreinigungsplatte wird vom Vakuummanifold abgenommen und auf ein Saugpapier gestellt. Die Auffangplatte wird im Vakuummanifold ausgeleert und wieder eingesetzt. Mit 50µl HPLC-Wasser, welches in die Wells der Aufreinigungsplatte pipettiert wird, werden die PCR-Produkte gelöst. Die Platte wird mit einer Klebefolie geschlossen und 10 Minuten auf einem Vortexmixer bei 750rpm geschüttelt. Das gelöste PCR-Produkt wird dann aus der Aufreinigungsplatte in die UV-Vermessungsplatte umpipettiert. Es wird erneut durch Gelelektrophorese überprüft, ob die aufgereinigten PCR-Produkte vorhanden

sind. Dies erfolgt durch Konzentrationsbestimmung der aufgereinigten Platten bei 260nm/230nm und 260nm/280nm am *SpectraMax*. Wieder ist ein Verhältnis von 1,8 bis 2,0 zu erwarten. Abweichungen weisen entsprechend auf Verunreinigung hin.

2.2.7 Sequenzierung

2.2.7.1 Ansatz und Fällung

Um die Gensequenz (die Nukleotidreihenfolge) der amplifizierten DNA-Abschnitte zu bestimmen, erfolgt eine Sequenzierung nach dem Prinzip des Kettenabbruchverfahrens nach Sanger (Sanger, Nicklen und Coulson 1977). Dabei handelt es sich um eine Amplifikation der DNA wie bei der PCR. Allerdings sind im Ansatz neben den dNTPs auch fluoreszenzmarkierte Didesoxynukleotide (ddNTPs) enthalten. Werden diese ddNTPs bei der Strangsynthese zufällig in die DNA eingebaut, führt dies zu einem Abbruch der DNA. Jedes der vier Nukleotide (ddATP, ddGTP, ddCTP und ddTTP) ist dabei mit einem anderen Fluoreszenzfarbstoff markiert. So kann im Nachhinein die Position der Nukleotide genau nachvollzogen werden. Die Reaktion erfolgt auf einer 96-well Platte (V-Boden) und wird für den Forward- und Reverse-Strang in getrennten Wells angeordnet. Verwendet wird das *Big Dye Terminator Version 1.1 Cycle Sequencing Kit*. Die Exons werden mit den einheitlichen M13-Sequenzierprimern sequenziert (siehe hierzu 2.2.4.2). Der Ansatz muss auf Eis erfolgen. Für die Sequenzierreaktion werden folgende Mengen benötigt:

- 1µl M13-Primer (Forward bzw. Reverse)
- 2µl 5xSequencing-Buffer
- 0,75µl Big Dye Terminator Mix Version 1.1
- x aufgereinigtes PCR-Produkt (Template)
- y HPLC (high performance liquid chromatography)- gereinigtes Aqua dest.

Die Template-Menge x und die Menge an HPLC-gereinigtem Wasser y ist abhängig von der DNA-Konzentration des PCR-Produktes:

Menge des PCR-Produkts	x	y
< 5ng	2µl	4µl
5ng - 20ng	1µl	5µl
> 20ng	0,5µl	5,5µl

Folgendes Programm wird im Thermocycler verwendet:

Temperatur	Dauer	Anzahl der Zyklen	Vorgang
96°C	1 Minute	25 Zyklen	Denaturierung
96°C	10 Sekunden		Denaturierung
50°C	5 Sekunden		Annealing
60°C	2-3 Minuten		Extension
15°C	Dauerhaft		Kühlen

Zur Fällung der Sequenzierprodukte werden 2,5µl 125mM EDTA und 30µl 100% Ethanol benötigt. Nach 15 Minuten Inkubationszeit im Kühlschrank im Dunkeln wird die Platte auf der auf 4°C heruntergekühlten Rotana Zentrifuge 30 Minuten bei 2500G zentrifugiert. Währenddessen ist die Platte mit einem Scotch-Pad verschlossen. Sofort nach dem Zentrifugieren wird der Scotch-Pad abgezogen. Ein herkömmliches Taschentuch (Kleenex) wird auf die Platte gelegt und diese dann umgekippt. Weiterhin umgedreht auf frischem Kleenex wird die Platte bis ca. 185G zentrifugiert, um den restlichen Überstand abzuzentrifugieren. Nun wird nochmal 30µl 70%iges Ethanol in die Wells der Platte pipettiert und die Platte 15 Minuten lang bei 2500G (4°C) zentrifugiert. Wieder wird ein Kleenex auf die Platte gelegt und diese umgekippt und nochmals auf frischem Kleenex eine Minuten bei 185G zentrifugiert, um den restlichen Überstand abzuzentrifugieren. Nun wird die Platte in die Speed-Vac Zentrifuge gestellt und bei 35° C im Vakuum 15 Minuten getrocknet.

2.2.7.2 DNA-Sequenzanalyse und Auswertung

Zur DNA-Sequenzanalyse werden die CycleSeq-Produkte kapillarelektrophoretisch aufgetrennt. Verwendet wird der *ABI 3730xl-Sequence-Analyzer*. Es entsteht das Elektropherogramm der DNA-Sequenz, das auf Mutationen und Polymorphismen in der Sequenz untersucht werden kann.

Zum getrockneten DNA-Pellet wird 20µl Formamid pipettiert, eine Gummimatte (*Septa Strip for 96 well tray*) auflegt und auf einem Schüttler das DNA-Pellet 10 Minuten resuspendiert und danach kurz anzentrifugiert. Die Platte wird auf die 96-Well-Platte gestellt und verschlossen. Die Sequenzanalyse wird am Gerät gestartet. Zur Auswertung der Daten werden diese in die Software *SeqPilot (JSI medical systems GmbH, Kippenheim, Deutschland)* importiert. Jedes Exon wird einzeln angesehen, überprüft und editiert.

2.2.7.3 Begriffsdefinitionen

- Mutation: Veränderung des genetischen Materials durch Austausch, Insertion, Deletion oder Duplikation einer/mehrerer Basen.
- Polymorphismus: Austausch, der bei über 1% der Bevölkerung vorkommt, wobei von einer sehr geringen Penetranz bzw. Auswirkung auszugehen ist.
- Sequenzvariante: Basenaustausch, welcher weder in der Literatur noch in den Datenbanken beschrieben ist und/oder bei dem die klinische Relevanz unklar ist.
- Intronvariante: Austausch im Intron, die vermutlich keinen Einfluss auf das Splicing hat, aber auch nicht als Polymorphismus in Datenbanken beschrieben ist.
- Mosaik: Nur ein Teil der Zellen weist eine Mutation auf.

2.2.8 Materialien

Chemikalien und Reagenzien:	Hersteller:
5xSequencing-Buffer	Life Technologies, Applied Biosystems, U.S.A.
Agarose	Life Technologies, Applied Biosystems, U.S.A.
Big Dye Terminator Sequencing Kit Version 1.1	Life Technologies, Applied Biosystems, U.S.A.
DMSO	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
dNTPs (Nukleotide Mix) (2 mM)	Roche, U.S.A.
EDTA (125mM)	Life Technologies, Applied Biosystems, U.S.A.
Ethanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethidiumbromid	Life Technologies, Applied Biosystems, U.S.A.
Formamid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Gentra Purgene DNA Purification Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
Isopropanol (100%iges)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Loading Dye	New England Biolabs, Frankfurt, Deutschland
M13-Sequenzierprimer (Forward und Reverse)	Life Technologies, Applied Biosystems, U.S.A.
MgCl ₂ (25mM)	Life Technologies, Applied Biosystems, U.S.A.
10xPCR-Puffer	Life Technologies, Applied Biosystems, U.S.A.
Primer Mix	Life Technologies, Applied Biosystems, U.S.A.
Taq-Polymerase [5U/μl]	Qiagen, Hilden, Deutschland
TBE-Puffer: 108 g Trisbase, 55 g Borsäure, 40 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0)	Life Technologies, Applied Biosystems, U.S.A.

Verbrauchsartikel:	Hersteller:
96-well Platte (V-Boden)	Merck Millipore, U.S.A.
MultiScreen PCR-96-well Plate	Merck Millipore, U.S.A.

Geräte:	Hersteller:
ABI 3730xl-Sequence-Analyzer	Life Technologies, Applied Biosystems, U.S.A.
Hamilton Chemagic STAR	Hamilton Robotics, U.S.A.
Makrozentrifuge	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Mikrozentrifuge	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Molecular Imager Gel Doc XR System	Bio Rad Laboratories, U.S.A.
NanoDrop 1000 Spektralphotometer	PEQLAB Biotechnologie, Erlangen, Deutschland
Rotana Zentrifuge	Andreas Hettich GmbH & Co, Tuttlingen, Deutschland
Speed-Vac Zentrifuge	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
SpectraMax	Molecular Devices, LLC, U.S.A.
Thermocycler	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Vakuummanifold	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Vortexer	Fisher Scientific, U.S.A.

- Patienten, Methoden und Materialien -

Software:	Hersteller:
Excel	Microsoft, U.S.A.
Lab 2.0	Bio Rad Laboratories, U.S.A.
SeqPilot	JSI medical systems GmbH, Kippenheim, Deutschland
Word	Microsoft, U.S.A.

2.2.9 Der Fragebogen

Zunächst wurden die behandelnden Ärzte der Patienten telefonisch kontaktiert. Sie wurden darüber in Kenntnis gesetzt, dass die vorliegende Studie durchgeführt wird. Erklärten sich die Ärzte einverstanden, bei dieser Studie mitzuwirken, wurden die zugehörigen Unterlagen an die Ärzte verschickt. Hierzu zählten:

1. Anschreiben an den/die behandelnde/n Arzt/Ärztin
2. Informationsschreiben für den/die Patienten/in:
 - Für den/die Erwachsene/n bzw. Jugendliche/n (**Abb. 6**)
 - Für Kinder wurde ein eigenes Informationsschreiben entworfen und ein Eltern-Informationsblatt hinzugefügt (**Abb. 7** und **Abb. 8**)
3. Einverständniserklärung (**Abb.9**)
4. Zweiseitiger Fragebogen (**Abb.10** und **Abb. 11**)

Das Informationsschreiben für die Patienten wurde so formuliert, dass es auch für den Laien möglich ist, nachvollziehen zu können, was bei der Studie untersucht wird und welches Ziel die Studie verfolgt. Das Informationsschreiben für Kinder wurde leicht verständlich verfasst. Bei Fragen konnten sich die Patienten sowohl an ihren behandelnden Arzt als auch an uns wenden. Die Patienten wurden im Informationsschreiben und in der Einverständniserklärung darüber aufgeklärt, dass eine Speicherung der Daten entsprechend des Datenschutzgesetzes für 10 Jahre notwendig ist. Sie wurden außerdem darüber in Kenntnis gesetzt, dass eine Auswertung und Veröffentlichung der Daten in pseudonymisierter Form erfolgt. Hierzu willigten die Patienten bzw. die Eltern der Patienten in der Einverständniserklärung ein. Der Fragebogen wurde mit Hilfe des/der behandelnden Arztes/Ärztin ausgefüllt. Der Fragebogen beinhaltet Fragen zur Familienanamnese, zur Symptomatik und zu laborchemischen Befunden des Patienten. Des Weiteren wurde nach Nierenbiopsien, Medikamenteneinnahmen, Dialysepflichtigkeit und Nierentransplantationen gefragt. War ein Patient nierentransplantiert, wurden bezüglich Hämaturie und Proteinurie, die Befunde ermittelt, die der Patient aufwies, bevor er die Transplantatniere erhielt. Wurden genaue Angaben zur Proteinurie gemacht, bzw. waren Laborbefunde mit genauen Werten zur Proteinurie vorhanden, so galt:

- Proteinurie bis 199 mg/dl aber nachweisbar entspricht „+“
- Proteinurie zwischen 200 mg/dl und 699 mg/dl entspricht „++“
- Proteinurie ab 700 mg/dl entspricht „+++“



MVZ Martinsried
Ärztliche Leitung
Dr. med. Hanns-Georg Klein
Facharzt für Laboratoriumsmedizin
Medizinische Genetik
Dr. med. Imma Rost
Fachärztin für Humangenetik
Fachärztin für Kinderheilkunde

Klinische Genetik
Dr. med. Imma Rost
Dr. med. Babet Heye¹
Molekulargenetik
Dr. rer. nat. Christoph Marschall
Dr. rer. nat. Karin Mayer²
Neurogenetik
Dr. rer. biol. hum. S. Chahrokh-Z.
Dr. med. Imma Rost
Stoffwechselfolgen
Dipl.-Biol. Wolfgang Rupprecht
Dipl.-Biol. Birgit Busse
Zytogenetik
Dipl.-Biol. Uwe Heinrich³
Dr. rer. nat. Annett Wagner
Molekulare Onkologie
Dipl.-Ing. Tanja Hinrichsen
Dr. rer. nat. Karin Mayer²
Reproduktionsgenetik
Dr. rer. nat. Annett Wagner
Dipl.-Biol. Uwe Heinrich³
Immunogenetik
Dr. med. Kaimo Hirv^{1,4}
Dr. med. Hanns-Georg Klein
Pharmako-/Nutrigenetik
Dipl.-Biol. Birgit Busse
Dipl.-Biol. Wolfgang Rupprecht
Mol. Mikrobiologie/Virologie
Dr. med. Hanns-Georg Klein
Dr. med. Kaimo Hirv^{1,4}
Immunbiologie/Klinische Chemie
Dipl.-Ing. Monika Bühl-Göpfert
Dr. med. Hanns-Georg Klein
Abstammungsgutachten
Dr. rer. nat. Christoph Marschall
Dr. med. Kaimo Hirv^{1,4}

¹ Fachärztin Humangenetik
² Fachhumangenetiker(in)
³ Facharzt für Transfusionsmedizin
⁴ EFI-Direktor

Lochhamer Str. 29
D-82152 Martinsried
Tel.: +49.89.895578-0
Fax +49.89.895578-780

info@medizinische-genetik.de
www.medizinische-genetik.de

Deutsche Apotheker u. Ärztebank
BLZ 300 606 01
Kto. 634 11 79
BIC (Swift-Code): DAAEDED3
IBAN-Nummer:
DE 52 3006 0601 0006 3411 79

USI - IdNr. DE 240471255

Abdruckverbot
DIN EN ISO/IEC 15025:2012/EN ISO 15189



Revised 14.7.10 04 10117

Patienten-Information (Jugendliche/Erwachsene)

Studie zur Genotyp-Phänotyp-Korrelation bei Patienten mit Alport-Syndrom

Sehr geehrte Patientinnen, sehr geehrte Patienten,

Sie wurden von Ihrem betreuenden Arzt auf unsere Studie hingewiesen. Wir möchten Ihnen im Folgenden kurz den Inhalt dieser Arbeit vorstellen:

Beim Alport-Syndrom handelt es sich um eine genetisch bedingte Erkrankung der Nieren. Ursache ist eine Fehlbildung des Kollagens, welches Hauptbestandteil von Bindegewebe im Körper ist. Somit können auch weitere Organe des Körpers von der Erkrankung betroffen sein, so beispielsweise Augen und Ohren. Bisher sind Veränderungen (Mutationen) in drei Genen bekannt, die für das Alport-Syndrom ursächlich sind. Eines dieser Gene, in dem die häufigsten Mutationen beobachtet werden, befindet sich auf dem X-Chromosom. Da Jungen nur ein X-Chromosom besitzen, sind sie meist schwerer betroffen als Mädchen. Trotzdem können auch Mädchen am Alport-Syndrom erkranken.

Ziel dieser Studie ist es zu untersuchen, inwieweit sich klinischer Schweregrad und Verlauf der Erkrankung bei weiblichen von männlichen Patienten unterscheiden. Sie wurden bereits molekulargenetisch untersucht. Mit Hilfe eines Fragebogens an Sie und Ihren Arzt wollen wir klären, ob ein Zusammenhang zwischen den Mutationen, die wir bei Ihnen nachgewiesen haben, und der klinischen Ausprägung der Erkrankung besteht. Wir würden Sie daher bitten, uns mit Hilfe Ihres Arztes einige Fragen zu Ihrer Krankheit zu beantworten. Mit Hilfe dieser Daten können wir die klinische Ausprägung der Erkrankung bei männlichen und weiblichen Patienten miteinander vergleichen.

Sämtliche Daten werden entsprechend des Datenschutzgesetzes 10 Jahre aufbewahrt. Die wissenschaftliche Auswertung und Veröffentlichung der Daten erfolgt in pseudonymisierter Form in Zusammenarbeit mit dem Dr. v. Haunerschen Kinderspital in München. Alle Mitarbeiter unterliegen der Ärztlichen Schweigepflicht. Es wird versichert, dass keine individualisierten Daten an Dritte weitergegeben werden.

Wir können Ihnen zwar selbst keinen Vorteil aus der Studie versprechen, allerdings könnten Sie so der Wissenschaft einen Beitrag an der Erforschung des Alport-Syndroms leisten. Sie haben jederzeit die Möglichkeit, ohne Angaben von Gründen und ohne jegliche Nachteile von dieser Studie zurückzutreten und die Vernichtung Ihrer Daten zu verlangen.

Wir danken Ihnen für die Bereitschaft, an der Studie teilzunehmen.

Mit freundlichen Grüßen

Dr. J. Höfele PD Dr. L. Weber S. Beicht

Abb. 6: Patienten-Informationsschreiben (Jugendliche/Erwachsene)



**Patienten-Information
(Kinder)**

Studie zur Genotyp-Phänotyp-Korrelation bei Patienten mit Alport-Syndrom

Liebe Patientin, lieber Patient,

die Ärzte haben bei Dir eine Krankheit festgestellt, die sich Alport-Syndrom nennt. Hierbei kommt es zu einer Störung der Nieren. Mit Hilfe der Nieren wird Flüssigkeit, die Du trinkst, wieder ausgeschieden. Da Deine Nieren nicht wie bei anderen Kindern funktionieren, kann es bei Dir dort zu Problemen kommen. Auch anderer Organe Deines Körpers können betroffen sein.

Wir Ärzte wissen noch nicht genau, warum es zu dieser Erkrankung kommt. Die Krankheit ist auch nicht immer gleich. Bei manchen Kindern verläuft sie schwerer als bei anderen. Bei Jungen ist die Krankheit meist ausgeprägter als bei Mädchen, aber auch Mädchen können an dieser Krankheit leiden. Niemand weiß genau, warum dies so ist.

Wir wollen nun untersuchen, inwieweit sich der Verlauf der Erkrankung bei Mädchen und bei Jungen unterscheidet. Außerdem haben wir schon einmal von Dir Blut abgenommen und Dein Erbgut untersucht. Wir haben geschaut, ob es Veränderungen in Deinem Erbgut gibt, die für die Erkrankung verantwortlich sein können. Jetzt wollen wir untersuchen, wie diese Veränderungen Deines Erbguts den Verlauf Deiner Erkrankung beeinflussen.

Deswegen wollen wir Dir, Deinen Eltern und Deinem Arzt ein paar Fragen zu Deiner Erkrankung stellen. Du bist nicht gezwungen, die Fragen zu beantworten und Du kannst das Ganze jederzeit abbrechen. Wir wären Euch aber sehr dankbar, wenn Ihr unsere Fragen beantworten könntet, weil wir so vielleicht mehr über die Erkrankung Alport-Syndrom erfahren, und wir können so vielleicht eines Tages Dir und anderen Menschen mit der gleichen Erkrankung besser helfen. Alle Mitarbeiter an dieser Studie sind zu Verschwiegenheit verpflichtet, das heißt, dass Deine Daten an keinen Dritten weitergegeben werden.

Hast Du noch Fragen? Die kannst Du nun Deinem Arzt stellen.

Wir danken Dir für Deine Bereitschaft, an der Studie teilzunehmen.

Mit freundlichen Grüßen

Dr. J. Höfele

PD Dr. L. Weber

S. Beicht

MVZ Martinsried
Ärztliche Leitung
Dr. med. Hanns-Georg Klein
Facharzt für Laboratoriumsmedizin
Medizinische Genetik
Dr. med. Imma Rost
Fachärztin für Humangenetik
Fachärztin für Kinderheilkunde

Klinische Genetik
Dr. med. Imma Rost
Dr. med. Babet Heye¹
Molekulargenetik
Dr. rer. nat. Christoph Marschall
Dr. rer. nat. Karin Mayer²
Neurogenetik
Dr. rer. biol. hum. S. Chahrokh-Z.
Dr. med. Imma Rost
Stoffwechselfenetik
Dipl.-Biol. Wolfgang Rupprecht
Dipl.-Biol. Birgit Busse
Zytogenetik
Dipl.-Biol. Uwe Heinrich³
Dr. rer. nat. Annett Wagner
Molekulare Onkologie
Dipl.-Ing. Tanja Hinrichsen
Dr. rer. nat. Karin Mayer²
Reproduktionsgenetik
Dr. rer. nat. Annett Wagner
Dipl.-Biol. Uwe Heinrich³
Immunogenetik
Dr. med. Kaimo Hirv⁴
Dr. med. Hanns-Georg Klein
Pharmako-/Nutrigenetik
Dipl.-Biol. Birgit Busse
Dipl.-Biol. Wolfgang Rupprecht
Mol. Mikrobiologie/Virologie
Dr. med. Hanns-Georg Klein
Dr. med. Kaimo Hirv⁴
Immunbiologie/Klinische Chemie
Dipl.-Ing. Monika Bühl-Göpfert
Dr. med. Hanns-Georg Klein
Abstammungsgutachten
Dr. rer. nat. Christoph Marschall
Dr. med. Kaimo Hirv⁴

¹ Fachärztin Humangenetik
² Fachhumangenetiker(in)
³ Facharzt für Transfusionsmedizin
⁴ EFI-Direktor

Lochhamer Str. 29
D-82152 Martinsried

Tel.: +49.89.895578-0
Fax +49.89.895578-780

info@medizinische-genetik.de
www.medicinische-genetik.de

Deutsche Apotheker u. Ärztekammer
BLZ 300 606 01
Kto. 634 11 79
BIC (Swift-Code): DAAEEDDD
IBAN-Nummer:
DE 52 3006 0601 0006 3411 79

USI - IdNr. DE 240471255

Abdruckverbot nach
DIN EN ISO/IEC 17025:2005/DIN EN ISO 15189



Version 14.7.19 04.10.19

Abb. 7: Patienten-Informationsschreiben (Kinder)



MVZ Martinsried
Ärztliche Leitung
Dr. med. Hanns-Georg Klein
Facharzt für Laboratoriumsmedizin
Medizinische Genetik
Dr. med. Imma Rost
Fachärztin für Humangenetik
Fachärztin für Kinderheilkunde

Klinische Genetik
Dr. med. Imma Rost
Dr. med. Babet Heye¹
Molekulargenetik
Dr. rer. nat. Christoph Marschall
Dr. rer. nat. Karin Mayer²
Neurogenetik
Dr. rer. biol. hum. S. Chahrokh-Z.
Dr. med. Imma Rost
Stoffwechselfolgen
Dipl.-Biol. Wolfgang Rupprecht
Dipl.-Biol. Birgit Busse
Zytogenetik
Dipl.-Biol. Uwe Heinrich³
Dr. rer. nat. Annett Wagner
Molekulare Onkologie
Dipl.-Ing. Tanja Hinrichsen
Dr. rer. nat. Karin Mayer²
Reproduktionsgenetik
Dr. rer. nat. Annett Wagner
Dipl.-Biol. Uwe Heinrich³
Immunogenetik
Dr. med. Kaimo Hirv⁴
Dr. med. Hanns-Georg Klein
Pharmako-/Nutrigenetik
Dipl.-Biol. Birgit Busse
Dipl.-Biol. Wolfgang Rupprecht
Mol. Mikrobiologie/Virologie
Dr. med. Hanns-Georg Klein
Dr. med. Kaimo Hirv⁴
Immunbiologie/Klinische Chemie
Dipl.-Ing. Monika Bühl-Göpfert
Dr. med. Hanns-Georg Klein
Abstammungsgutachten
Dr. rer. nat. Christoph Marschall
Dr. med. Kaimo Hirv⁴

¹ Fachärztin Humangenetik
² Fachhumangenetiker(in)
³ Facharzt für Transfusionsmedizin
⁴ EFI-Direktor

Lochhamer Str. 29
D-82152 Martinsried
Tel.: +49.89.895578-0
Fax +49.89.895578-780

info@medizinische-genetik.de
www.medizinische-genetik.de

Deutsche Apotheker u. Ärztebank
BLZ 300 606 01
Kto. 634 11 79
BIC (Swift-Code): DAAEDED3
IBAN-Nummer:
DE 52 3006 0601 0006 3411 79

USI - IdNr. DE 240471255

Abwasser nach
DIN EN ISO/IEC 17025:2018/ISO 15189



Revised 14.7.18 04 11117

Eltern-Information

Studie zur Genotyp-Phänotyp-Korrelation bei Patienten mit Alport-Syndrom

Sehr geehrte Eltern,

Sie wurden von Ihrem betreuenden Arzt auf unsere Studie hingewiesen. Wir möchten Ihnen im Folgenden kurz den Inhalt dieser Arbeit vorstellen:

Beim Alport-Syndrom handelt es sich um eine genetisch bedingte Erkrankung der Nieren. Ursache ist eine Fehlbildung des Kollagens, welches Hauptbestandteil von Bindegewebe im Körper ist. Somit können auch weitere Organe des Körpers von der Erkrankung betroffen sein, so beispielsweise Augen und Ohren. Bisher sind Veränderungen (Mutationen) in drei Genen bekannt, die für das Alport-Syndrom ursächlich sind. Eines dieser Gene, in dem die häufigsten Mutationen beobachtet werden, befindet sich auf dem X-Chromosom. Da Jungen nur ein X-Chromosom besitzen, sind sie meist schwerer betroffen als Mädchen. Trotzdem können auch Mädchen am Alport-Syndrom erkranken.

Ziel dieser Studie ist es zu untersuchen, inwieweit sich klinischer Schweregrad und Verlauf der Erkrankung bei weiblichen von männlichen Patienten unterscheiden. Ihr Kind wurde bereits molekulargenetisch untersucht. Mit Hilfe eines Fragebogens an Sie und Ihren Arzt wollen wir nun klären, ob ein Zusammenhang zwischen den Mutationen, die wir bei Ihrem Kind nachgewiesen haben, und der klinischen Ausprägung der Erkrankung besteht. Wir würden Sie daher bitten, uns mit Hilfe Ihres Arztes Fragen zur Krankheit Ihres Kindes zu beantworten. Mit Hilfe dieser Daten können wir die klinische Ausprägung der Erkrankung bei männlichen und weiblichen Patienten miteinander vergleichen.

Sämtliche Daten werden entsprechend des Datenschutzgesetzes 10 Jahre aufbewahrt. Die wissenschaftliche Auswertung und Veröffentlichung der Daten erfolgt in pseudonymisierter Form in Zusammenarbeit mit dem Dr. v. Haunerschen Kinderspital in München. Alle Mitarbeiter unterliegen der Ärztlichen Schweigepflicht. Es wird versichert, dass keine individualisierten Daten an Dritte weitergegeben werden.

Wir können Ihnen zwar selbst keinen Vorteil aus der Studie versprechen, allerdings könnten Sie so der Wissenschaft einen Beitrag an der Erforschung des Alport-Syndroms leisten. Sie haben jederzeit die Möglichkeit, ohne Angaben von Gründen und ohne jegliche Nachteile, von dieser Studie zurück-zutreten und die Vernichtung der Daten Ihres Kindes zu verlangen.

Wir danken Ihnen für die Bereitschaft, an der Studie teilzunehmen.

Mit freundlichen Grüßen

Dr. J. Höfele PD Dr. Weber S. Beicht

Abb. 8: Patienten-Informationsschreiben (Eltern)



MVZ Martinsried
Ärztliche Leitung
Dr. med. Hanns-Georg Klein
Facharzt für Laboratoriumsmedizin
Medizinische Genetik
Dr. med. Imma Rost
Fachärztin für Humangenetik
Fachärztin für Kinderheilkunde

Klinische Genetik
Dr. med. Imma Rost
Dr. med. Babett Heye¹
Molekulargenetik
Dr. rer. nat. Christoph Marschall
Dr. rer. nat. Karin Mayer²
Neurogenetik
Dr. rer. biol. hum. S. Chahrokh-Z.
Dr. med. Imma Rost
Stoffwechselfenetik
Dipl.-Biol. Wolfgang Rupprecht
Dipl.-Biol. Birgit Busse
Zytogenetik
Dipl.-Biol. Uwe Heinrich³
Dr. rer. nat. Annett Wagner
Molekulare Onkologie
Dipl.-Ing. Tanja Hinrichsen
Dr. rer. nat. Karin Mayer²
Reproduktionsgenetik
Dr. rer. nat. Annett Wagner
Dipl.-Biol. Uwe Heinrich³
Immungenetik
Dr. med. Kaimo Hirv^{1,4}
Dr. med. Hanns-Georg Klein
Pharmako-/Nutrigenetik
Dipl.-Biol. Birgit Busse
Dipl.-Biol. Wolfgang Rupprecht
Mol. Mikrobiologie/Virologie
Dr. med. Hanns-Georg Klein
Dr. med. Kaimo Hirv^{1,4}
Immunbiologie/Klinische Chemie
Dipl.-Ing. Monika Bühl-Göpfert
Dr. med. Hanns-Georg Klein
Abstammungsgutachten
Dr. rer. nat. Christoph Marschall
Dr. med. Kaimo Hirv^{1,4}

¹ Fachärztin Humangenetik
² Fachhumangenetiker(in)
³ Facharzt für Transfusionsmedizin
⁴ EFI-Direktor

Lochamer Str. 29
D-82152 Martinsried
Tel.: +49.89.895578-0
Fax +49.89.895578-780

info@medizinische-genetik.de
www.medizinische-genetik.de

Deutsche Apotheker u. Ärztekammer
BLZ 300 606 01
Kto. 634 11 79
BIC (Swift-Code): DAAEEDDD
IBAN-Nummer:
DE 52 3006 0601 0006 3411 79

USI-IdNr. DE 240471255

Ärztlicher Rat
DIN EN ISO/IEC 17025:2005 DIN EN ISO 15189



Revised 14.7.19 04.10.19

Einverständniserklärung

Studie zur Genotyp-Phänotyp-Korrelation bei Patienten mit Alport-Syndrom

Im Zentrum für Humangenetik und Laboratoriumsmedizin Dr. Klein, Dr. Rost und Kollegen in Martinsried wird in Zusammenarbeit mit dem Dr. von Haunerschen Kinderspital in München die klinische Ausprägung und der Verlauf des Alport-Syndroms bei weiblichen und männlichen Patienten untersucht. Derzeit wird erforscht, ob eine Korrelation mit genetischen Mutationen besteht. Da Sie oder Ihr Kind von dieser Erkrankung betroffen sind, würden die Untersucher Ihnen gerne einige Fragen zu Beginn und Verlauf der Erkrankung stellen. Dies erfolgt in schriftlicher Form im Sinne eines Fragebogens (siehe Anlage). Sie werden gebeten, diesen Fragebogen mit Hilfe Ihres betreuenden Arztes auszufüllen. Hierdurch werden klinische Daten erfasst und können dann miteinander verglichen werden.

Für die Auswertung ist die Speicherung Ihrer persönlichen Angaben notwendig. Die Daten werden entsprechend des Datenschutzgesetzes 10 Jahre aufbewahrt. Die wissenschaftliche Auswertung und Veröffentlichung der Daten erfolgt in pseudonymisierter Form. Alle Mitarbeiter in Ihrem betreuenden Zentrum, am Zentrum für Humangenetik und Laboratoriumsmedizin Dr. Klein, Dr. Rost und Kollegen in Martinsried und im Dr. von Haunerschen Kinderspital in München unterliegen der Ärztlichen Schweigepflicht. Eine Weitergabe der Daten an Dritte erfolgt nicht. Sie haben jederzeit die Möglichkeit, von dieser Studie zurückzutreten und die Vernichtung Ihrer personenbezogenen Daten zu verlangen. Mit der Durchführung dieser Studie werden keinerlei kommerzielle Ziele verfolgt. Personen, welche an dieser Untersuchung teilnehmen, werden keinen unmittelbaren Nutzen aus den Ergebnissen haben. Möglicherweise können jedoch in Zukunft Sie bzw. Ihr Kind und andere betroffene Patienten von den neuen Erkenntnissen profitieren.

Hiermit willige ich in die Erfassung, Verarbeitung und Speicherung meiner personenbezogenen Daten/der personenbezogenen Daten meines Kindes zum vorgesehenen Zweck ein. Ein Exemplar der Eltern- bzw. Kinder- und Patienteninformation zur wissenschaftlichen Arbeit wurde mir ausgehändigt.

Ort, Datum

Unterschrift Patient

Unterschrift Eltern

Unterschrift Arzt

Abb. 9: Einverständniserklärung



Alport-Syndrom: Fragebogen Dr. J. Höfele, PD Dr. L. Weber, S. Beicht

I. Patientenstammdaten

Name: _____ Vorname: _____ geb. am: ____ (Tag)/ ____ (Monat)/ ____ (Jahr)
Geschlecht: männlich weiblich
Sind die Eltern blutsverwandt? ja nein
Gibt es Verwandte mit Nierenerkrankungen und wenn ja, welche?
 Mutter: _____ Vater: _____
 Schwester: _____ Bruder: _____
 sonstige: _____

II. Diagnosestellung:

____ (Tag)/ ____ (Monat)/ ____ (Jahr)
Größe: ____ cm Gewicht: ____ kg

1. Symptomatik (bei Diagnosestellung): Wenn möglich, bitte ärztlichen Bericht zusenden

Niere:

- Ödeme (Wassereinlagerungen)
- Polyurie (übermäßige Urinausscheidung)
- Polydipsie (übermäßiger Durst)
- Hypertonie → therapiebedürftig: ja nein

Sonstige:

- Mittelgesichtshypoplasie
- geistige Retardierung (Entwicklungsstörung)
- diffuse Leiomyomatose: ösophageal
 tracheo-bronchial
 genital
 andere Lokalisation
- sonstige Manifestationen: _____

Auge:

- Lentikonus (Formabweichung der Linse)
- Katarakt (Grauer Star)
- sonstige Augenveränderungen: _____

Ohr:

- Schwerhörigkeit/Hörstörung

2. Befunde (bei Diagnosestellung)

Blut:

- Kreatinin-Clearance: ____ ml/min
- Serum-Kreatinin: ____ mg/dl
- Serum-Harnstoff: ____ mg/dl
- Makrothrombozytopenie
- Leukozyteneinschlüsse
- Elliptozytose
- Immunologische Auffälligkeiten → wenn ja, welche: _____

Urin:

- Kreatinin: ____ mg/dl
- GFR: ____ ml/min
Mit welcher Methode bestimmt? _____
- Mikrohämaturie (Blut im Urin): O+ O++ O+++
- Proteinurie: _____

III. Aktueller Zeitpunkt:

____ (Tag)/ ____ (Monat)/ ____ (Jahr)
Größe: ____ cm Gewicht: ____ kg

1. Symptomatik (zum aktuellen Zeitpunkt) Wenn möglich, bitte ärztlichen Bericht zusenden

Niere:

- Ödeme (Wassereinlagerungen)
- Polyurie (übermäßige Urinausscheidung)
- Polydipsie (übermäßiger Durst)
- Hypertonie → therapiebedürftig: ja nein

Sonstige:

- Mittelgesichtshypoplasie
- geistige Retardierung (Entwicklungsstörung)
- diffuse Leiomyomatose: ösophageal
 tracheo-bronchial
 genital
 andere Lokalisation
- sonstige Manifestationen: _____

Auge:

- Lentikonus (Formabweichung der Linse)
- Katarakt (Grauer Star)
- sonstige Augenveränderungen: _____

Ohr:

- Schwerhörigkeit/Hörstörung

Abb. 10: Fragebogen (Seite 1)

2. Befunde (zum aktuellen Zeitpunkt)

Blut:

- Kreatinin-Clearance: _____ ml/min
 Serum-Kreatinin: _____ mg/dl
 Serum-Harnstoff: _____ mg/dl
 Makrothrombozytopenie
 Leukozyteneinschlüsse
 Elliptozytose
 Immunologische Auffälligkeiten → wenn ja, welche: _____

Urin:

- Kreatinin: _____ mg/dl
 GFR: _____ ml/min
Mit welcher Methode bestimmt?

 Mikrohämaturie (Blut im Urin): O+ O++ O+++
 Proteinurie:

IV. Nierenbiopsie: Wenn möglich, bitte Befundkopie zusenden

Wurde eine Nierenbiopsie durchgeführt?

nein ja → wenn ja:

- Erste Biopsie: _____(Tag)/_____(Monat)/_____(Jahr)
 Dünne Basalmembran-Nephropathie (TBMN)
 Fokal segmentale Glomerulosklerose (FSGS)
 Alport-Syndrom
 ohne Befund
 sonstiger Befund: _____

- Zweite Biopsie: _____(Tag)/_____(Monat)/_____(Jahr)
 Dünne Basalmembran-Nephropathie (TBMN)
 Fokal segmentale Glomerulosklerose (FSGS)
 Alport-Syndrom
 ohne Befund
 sonstiger Befund: _____

V. Behandlung

1. Medikamente

Renin-Angiotensin-System-Blockade durch ACE-Hemmer oder Angiotensin-Rezeptor-Blocker, z. Bsp.:

- Ramipril, Enalapril
- Losartan, Combisartan, Telmisartan

→ Einnahme seit:

_____(Monat)/_____(Jahr)

Cyclosporin

→ Einnahme seit:

_____(Monat)/_____(Jahr)

sonstige Medikamente

→ Einnahme seit:

-
-
-

_____(Monat)/_____(Jahr)
_____(Monat)/_____(Jahr)
_____(Monat)/_____(Jahr)

2. Dialyse/Nierentransplantation

Besteht Dialysepflicht? nein ja → wenn ja:
seit:

Hämodialyse Peritonealdialyse
_____(Monat)/_____(Jahr)

Wurde eine Nierentransplantation durchgeführt?

nein ja → wenn ja:

1. Transplantation:
2. Transplantation:

_____(Monat)/_____(Jahr)
_____(Monat)/_____(Jahr)

VI. Anmerkungen

Wenn Sie noch Anmerkungen oder Ergänzungen zur klinischen Ausprägung haben, bitten wir Sie diese nachzutragen:

Wir danken Ihnen vielmals für Ihre Mühe.

Bitte füllen Sie noch folgende Zeilen aus, damit wir Sie bei Rückfragen erreichen können.

Name:

Telefon:

Fax:

Anschrift:

E-mail:

Abb. 11: Fragebogen (Seite 2)

3 Ergebnisse

3.1 Das Patientenkollektiv

87 Patienten standen für molekulargenetische Untersuchungen zur Verfügung. Bei 67 Patienten konnten Mutationen in den Genen *COL4A3*, *COL4A4* oder *COL4A5* nachgewiesen werden. Dies entspricht somit einer Detektionsrate von 77,0%. Von den Patienten mit nachgewiesenen Mutationen hatten 17,9% diese in *COL4A3* (12 Patienten), 16,4% der Patienten hatten diese in *COL4A4* (11 Patienten) und 65,7% in *COL4A5* (44 Patienten). Von 38 Patienten mit nachgewiesenen Mutationen konnten vollständige Angaben zur klinischen Ausprägung der Erkrankung ermittelt werden. Das Patientenkollektiv besteht somit aus **38 Patienten**. Beim Patientenkollektiv handelt es sich um 17 weibliche Patientinnen und 21 männliche Patienten. Die Geschlechterverteilung war mit 44,7% weiblichen und 55,3% männlichen Patienten ausgewogen. Es befinden sich 24 pädiatrische (Alter \leq 18 Jahre) und 14 adulte Patienten (Alter $>$ 18 Jahre) im Kollektiv. Das mittlere Alter der Patienten beträgt 20,55 Jahre. Der jüngste Patient war 2 Jahre, der älteste Patient 64 Jahre alt.

Im Patientenkollektiv konnten bei 15,8% (6 Patienten) Mutationen in *COL4A3*, bei 10,5% (4 Patienten) Mutationen in *COL4A4* und bei 73,7% (28 Patienten) Mutationen in *COL4A5* nachgewiesen werden. Zu den Mutationen zählen bekannte Mutationen (BM), die bereits in der Literatur beschrieben waren. Die Mehrzahl der Mutationen ist jedoch unbekannt (UM) und wurde bis dato noch nicht beschrieben (**Tab. 1**) (vgl. HGMD, ARUP).

Von den insgesamt 40 nachgewiesenen Mutationen sind 22 Missense-Mutationen, bei denen es zu einem Austausch der Aminosäure kommt und zwei Nonsense-Mutationen, die zu einem vorzeitigen Proteinkettenabbruch führen. Daneben gibt es vier Frameshift-Mutationen, die zu einer Verschiebung des Leserasters führen und sieben Intron-Mutationen. Bei diesen Intron-Mutationen handelt es sich in der Regel um Splice-site-Mutationen: am Übergang von Intron zu Exon gibt es Erkennungssequenzen für das Spleißen. Die Erkennungssequenz am 3'-Ende des Intron nennt man Spleiß-Donor-Sequenz, die am 5'-Ende Spleiß-Akzeptor-Sequenz. Punktmutationen in diesen Bereichen führen zu einem aberranten Spleißen; daher der Name

Splice-site-Mutationen. Bei Patient 4 darf allerdings definitionsgemäß nicht von einer Splice-site Mutation gesprochen werden, da sich die Mutation mit IVS15+9 zu tief im Intron befindet (siehe **Tab. 2a** und **Tab. 21**). Es ist dennoch davon auszugehen, dass es auch bei dieser Mutation zu einem aberranten Spleißen kommt. Außerdem sind in unserem Patientenkollektiv eine stille Mutation, bei der es zwar zu keinem Austausch der AS kommt, die aber mit hoher Wahrscheinlichkeit zu aberrantem Spleißen führt, und vier Deletionen vorhanden (siehe auch **Tab. 2a, 3** und **4** oder **Tab. 21**). Bei Patientin 31 liegt die Mutation in Mosaikform vor (13-22% der Zellen sind von der Mutation betroffen).

- Ergebnisse -

Pat.	Geschl.	Alter	Gen	Nukleotidveränderung	AS-Veränderung	Exon/ Intron	
34	m	26	COL4A3	c.1219G>A (H)	p.Gly407Ser (H)	21	UM
33	m	33	COL4A3	c.4235G>A (h)	p.Gly1412Asp (h)	47	UM
36	m	8	COL4A3	c.4887_4888delCA (H)	p.Tyr1629* (H)	51	UM
16	w	5	COL4A3	c.3575G>A (h)	p.Gly1192Glu (h)	42	UM
9	w	34	COL4A3	c.1892G>T (h)	p.Gly631Val (h)	26	UM
				c.4981C>T (h)	p.Arg1661Cys (h)	52	BM
21	w	10	COL4A3	c.4280G>A (h)	p.Gly1427Asp (h)	48	UM
				c.4559_4561delCAT (h)	p.Ser1520del (h)	49	UM
26	m	10	COL4A4	c.4208_4209insC (h)	p.Ser1403ProfsX29 (h)	44	UM
27	w	33	COL4A4	c.1634G>C (h)	p.Gly545Ala (h)	23	UM
17	w	15	COL4A4	c.2219dupC (H)	p.Val741CysfsX47 (H)	28	UM
22	w	5	COL4A4	c.4820delC (h)	p.Ala1607ValfsX49 (h)	48	UM
28	m	64	COL4A5	Deletion Exon 2		2	UM
29	m	2	COL4A5	Deletion Exon 2		2	UM
37	m	7	COL4A5	c.384G>A	p.Lys128Lys	6	UM
19	m	5	COL4A5	c.560_561dupCC	p.Thr188ProfsX16	10	UM
7	m	18	COL4A5	c.973G>A	p.Gly325Arg	17	BM
10	m	17	COL4A5	c.965G>T	p.Gly322Val	17	UM
25	m	6	COL4A5	c.1871G>A	p.Gly624Asp	25	BM
38	m	11	COL4A5	c.1871G>A	p.Gly624Asp	25	BM
8	m	16	COL4A5	c.4787G>T	p.Gly1596Val	49	UM
35	m	14	COL4A5	c.4793C>T	p.Ser1598Phe	49	UM
5	m	51	COL4A5	c.4931C>G	p.Ser1644Cys	50	UM
6	m	61	COL4A5	c.4895G>A	p.Cys1632Tyr	50	UM
11	m	34	COL4A5	c.231+1G>A (IVS3+1G>A)		IVS3	BM
4	m	17	COL4A5	c.891+9T>G (IVS15+9T>G)		IVS15	UM
18	m	12	COL4A5	c.936+1G>A (IVS16+1G>A)		IVS16	UM
13	m	8	COL4A5	c.4510+1G>T (IVS47+1G>T)		IVS47	UM
3	m	15	COL4A5	c.4688+1G>A (IVS48+1G>A)		IVS48	UM
30	w	27	COL4A5	Deletion Exon 2 (h)		2	UM
1	w	39	COL4A5	c.973G>A (h)	p.Gly325Arg (h)	17	BM
2	w	17	COL4A5	c.1165G>A (h)	p.Gly389Arg (h)	19	UM
15	w	10	COL4A5	c.1073_1074insC (h)	p.Lys358AsnfsX53 (h)	19	UM
20	w	6	COL4A5	c.2605G>A (h)	p.Gly869Arg (h)	31	BM
14	w	5	COL4A5	c.3319G>A (h)	p.Gly1107Arg (h)	37	BM
12	w	55	COL4A5	c.3545G>T (h)	p.Gly1182Val (h)	39	UM
23	w	10	COL4A5	c.4793C>T (h)	p.Ser1598Phe (h)	49	UM
24	w	31	COL4A5	c.4931C>G (h)	p.Ser1644Cys (h)	50	UM
31	w	46	COL4A5	c.2396-1G>A (IVS29-1G>A); Mosaik 13-22%		IVS29	UM
32	w	29	COL4A5	c.2918-1G>C (IVS33-1G>C) (h)		IVS33	UM

Tab.1: Das Patientenkollektiv:

Alter in Jahren; w, weiblich (hell schraffiert); m, männlich (dunkel schraffiert); **UM**, unbekannte Mutation; **BM**, bekannte Mutation; (h) heterozygot; (H), homozygot; ansonsten hemizygot

3.1.1 Mutationsverteilung

Bei den Patienten mit Mutationen in *COL4A5* konnten folgende Nukleotid- und Aminosäuren-Veränderungen nachgewiesen werden (**Tab. 2a**):

- Ergebnisse -

Pat.	Sequenzvariation	Nukleotidveränderung	AS-Veränderung	Exon/Intron
28	Größere Deletion	Deletion Exon 2		2
29	Größere Deletion	Deletion Exon 2		2
30	Größere Deletion	Deletion Exon 2 (h)		2
37	Stille Mutation	c.384G>A	p.Lys128Lys	6
19	Duplikation	c.560_561dupCC	p.Thr188ProfsX16	10
10	Missense	c.965G>T	p.Gly322Val	17
1	Missense	c.973G>A (h)	p.Gly325Arg (h)	17
7	Missense	c.973G>A	p.Gly325Arg	17
15	Insertion	c.1073_1074insC (h)	p.Lys358AsnfsX53 (h)	19
2	Missense	c.1165G>A (h)	p.Gly389Arg (h)	19
25	Missense	c.1871G>A	p.Gly624Asp	25
38	Missense	c.1871G>A	p.Gly624Asp	25
20	Missense	c.2605G>A (h)	p.Gly869Arg (h)	31
14	Missense	c.3319G>A (h)	p.Gly1107Arg (h)	37
12	Missense	c.3545G>T (h)	p.Gly1182Val (h)	39
8	Missense	c.4787G>T	p.Gly1596Val	49
23	Missense	c.4793C>T (h)	p.Ser1598Phe (h)	49
35	Missense	c.4793C>T	p.Ser1598Phe	49
6	Missense	c.4895G>A	p.Cys1632Tyr	50
24	Missense	c.4931C>G (h)	p.Ser1644Cys (h)	50
5	Missense	c.4931C>G	p.Ser1644Cys	50
11	Splice site	c.231+1G>A (IVS3+1G>A)		IVS3
4	Intron-Mutation	c.891+9T>G (IVS15+9T>G)		IVS15
18	Splice site	c.936+1G>A (IVS16+1G>A)		IVS16
31	Splice site	c.2396-1G>A (IVS29-1G>A); Mosaik 13-22%		IVS29
32	Splice site	c.2918-1G>C (IVS33-1G>C) (h)		IVS33
13	Splice site	c.4510+1G>T (IVS47+1G>T)		IVS47
3	Splice site	c.4688+1G>A (IVS48+1G>A)		IVS48

Tab. 2a: Nukleotidveränderungen und AS-Veränderungen in *COL4A5*

AS, Aminosäure; (h) heterozygot; ansonsten hemizygot; Mitglieder einer Familie sind in derselben Farbe dargestellt

Die Mutationen in *COL4A5* sind gleichmäßig über das gesamte Gen verteilt. Dies wird **Abb. 12** grafisch dargestellt:

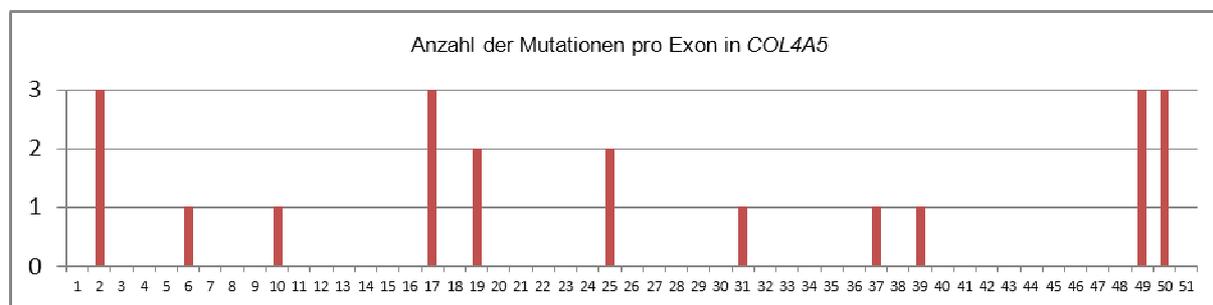


Abb. 12: Verteilung der Mutationen auf die Exons von *COL4A5*

Ein gehäuftes Auftreten von Mutationen in einem bestimmten Exon kam in der Regel dadurch zustande, dass sich im Patientenkollektiv zum Teil Mitglieder einer Familie befanden, die somit gleiche Mutationen aufwiesen. In **Tab. 2a** wurden die Mitglieder

einer Familie dementsprechend in derselben Farbe dargestellt. Dennoch fällt auf, dass im Kollektiv zweimal jeweils zwei Patienten exakt dieselbe Mutation aufwiesen, obwohl diese nicht miteinander verwandt sind: Patientin 1 und Patient 7, sowie Patient 25 und Patient 38 (separat in **Tab. 2b** dargestellt). In beiden Fällen handelt es sich um eine Glycin-Mutation. Für die Ausbildung der Trippelhelix im Kollagen-Protein ist es notwendig, dass jede dritte Aminosäure ein Glycin ist. Somit kommen Glycin-Mutationen gehäuft vor. Ein Glycin-Austausch im Protein führt zu einer Fehlbildung der Trippelhelix des Kollagens und damit zu einem Funktionsverlust der GBM (Hudson et al. 2003) (siehe Kap. 1.1.2). Die beiden hier aufgetretenen Glycin-Mutationen wurden beide bereits in der Literatur beschrieben (Knebelmann et al. 1992 und Martin et al. 1998). Sie scheinen häufiger aufzutreten. Dies gilt es allerdings, noch genauer zu untersuchen.

Pat.	Sequenzvariation	Nukleotidveränderung	AS-Veränderung	Exon
1	Missense	c.973G>A (h)	p.Gly325Arg (h)	17
7	Missense	c.973G>A	p.Gly325Arg	17
25	Missense	c.1871G>A	p.Gly624Asp	25
38	Missense	c.1871G>A	p.Gly624Asp	25

Tab. 2b: Nukleotidveränderungen und AS-Veränderungen in *COL4A5*, nicht-miteinander verwandte Patienten mit gleicher Mutation; AS, Aminosäure; (h) heterozygot; ansonsten hemizygot

Die Patienten mit Mutationen in *COL4A4* wiesen folgende Nukleotid- und Aminosäureveränderungen auf (**Tab. 3**):

Pat.	Sequenzvariation	Nukleotidveränderung	AS-Veränderung	Exon
27	Missense	c.1634G>C (h)	p.Gly545Ala (h)	23
17	Duplikation	c.2219dupC (H)	p.Val741CysfsX47 (H)	28
26	Insertion	c.4208_4209insC (h)	p.Ser1403ProfsX29 (h)	44
22	Deletion	c.4820delC (h)	p.Ala1607ValfsX49 (h)	48

Tab. 3: Nukleotidveränderungen und AS-Veränderungen in *COL4A4*
AS, Aminosäure; (h) heterozygot; (H), homozygot

Die Patienten mit Mutationen in *COL4A3* wiesen folgende Nukleotid- und Aminosäureveränderungen auf (**Tab. 4**). Hier wurden bei zwei Patienten zwei Mutationen nachgewiesen, die sich in verschiedenen Exons befanden:

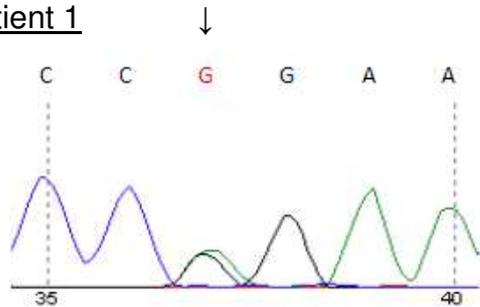
Pat.	Sequenzvariation	Nukleotidveränderung	AS-Veränderung	Exon
34	Missense	c.1219G>A (H)	p.Gly407Ser (H)	21
16	Missense	c.3575G>A (h)	p.Gly1192Glu (h)	42
33	Missense	c.4235G>A (h)	p.Gly1412Asp (h)	47
36	Deletion	c.4887_4888delCA (H)	p.Tyr1629* (H)	51
9	Missense	c.1892G>T (h)	p.Gly631Val (h)	26
	Missense	c.4981C>T (h)	p.Arg1661Cys (h)	52
21	Missense	c.4280G>A (h)	p.Gly1427Asp (h)	48
	Deletion	c.4559_4561delCAT (h)	p.Ser1520del (h)	49

Tab. 4: Nukleotidveränderungen und AS-Veränderungen in *COL4A3*

AS, Aminosäure; (h) heterozygot; (H), homozygot

3.1.2 Ergebnisse der Sequenzanalysen

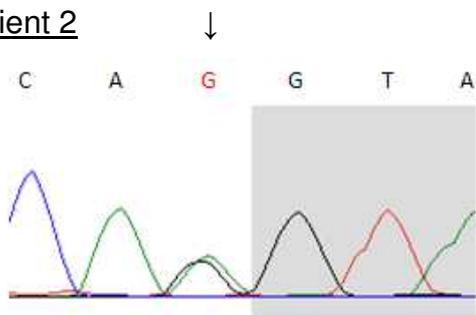
Patient 1



COL4A5/Exon 17

Gen: COL4A5
Exon 17
Nukleotidveränderung: c.973G>A (h)
AS-Veränderung: p.Gly325Arg (h)
Bekannte Mutation
Art der Sequenzvariation: Missense

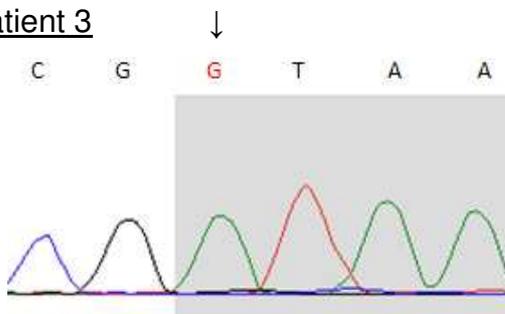
Patient 2



COL4A5/Exon 19 | COL4A5/Intron 19 |

Gen: COL4A5
Exon 19
Nukleotidveränderung: c.1165G>A (h)
AS-Veränderung: p.Gly389Arg (h)
Unbekannte Mutation
Art der Sequenzvariation: Missense

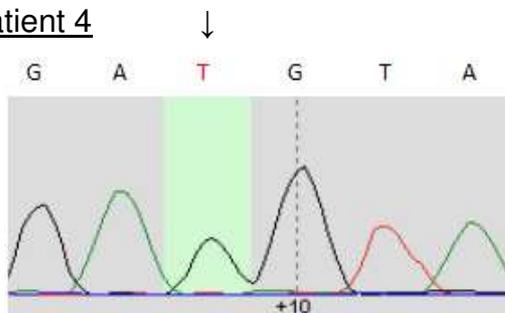
Patient 3



COL4A5/Exon 48 | COL4A5/Intron 48 |

Gen: COL4A5
Intron 48
Nukleotidveränderung: c.4688+1G>A (IVS48+1G>A)
Unbekannte Mutation
Art der Sequenzvariation: Splice site

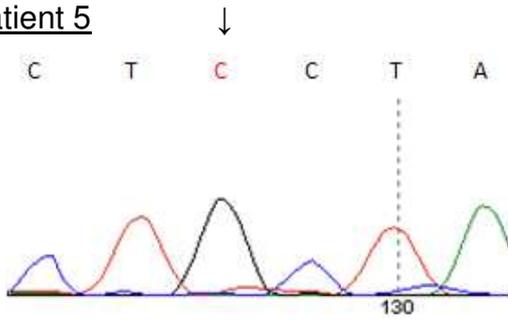
Patient 4



| COL4A5/Intron 15 |

Gen: COL4A5
Intron 15
Nukleotidveränderung: c.891+9T>G (IVS15+9T>G)
Unbekannte Mutation
Art der Sequenzvariation: Intron-Mutation

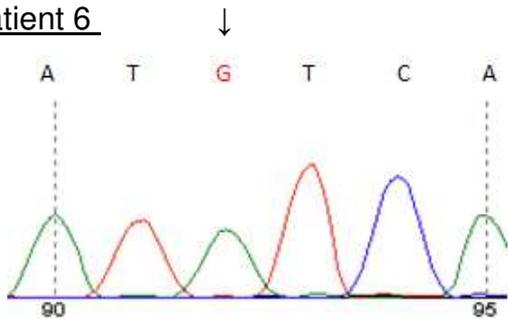
Patient 5



COL4A5/Exon 50

Gen: COL4A5
Exon 50
Nukleotidveränderung: c.4931C>G
AS-Veränderung: p.Ser1644Cys
Unbekannte Mutation
Art der Sequenzvariation: Missense

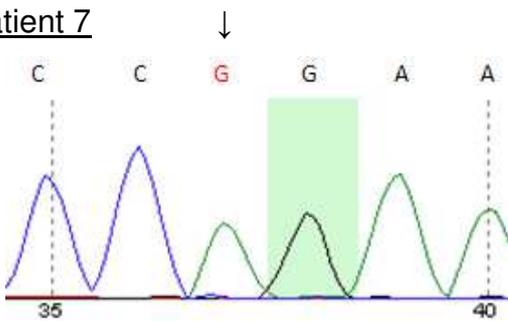
Patient 6



COL4A5/Exon 50

Gen: COL4A5
Exon 50
Nukleotidveränderung: c.4895G>A
AS-Veränderung: p.Cys1632Tyr
Unbekannte Mutation
Art der Sequenzvariation: Missense

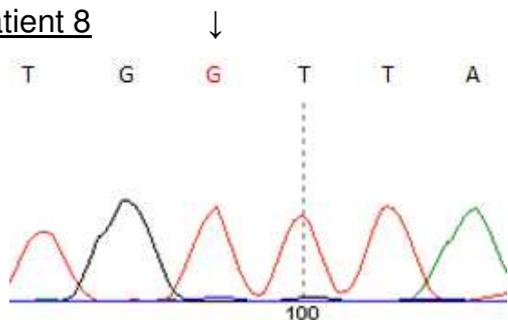
Patient 7



COL4A5/Exon 17

Gen: COL4A5
Exon 17
Nukleotidveränderung: c.973G>A
AS-Veränderung: p.Gly325Arg
Bekannte Mutation
Art der Sequenzvariation: Missense

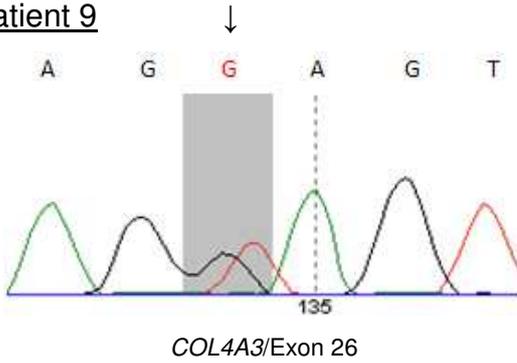
Patient 8



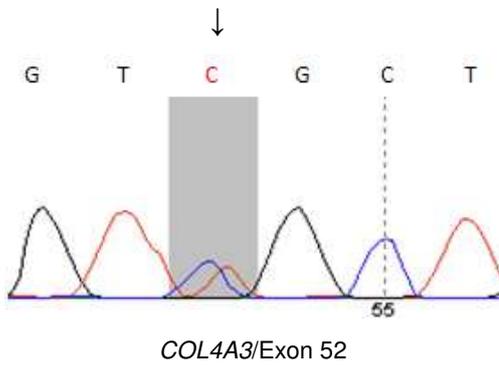
COL4A5/Exon 49

Gen: COL4A5
Exon 49
Nukleotidveränderung: c.4787G>T
AS-Veränderung: p.Gly1596Val
Unbekannte Mutation
Art der Sequenzvariation: Missense

Patient 9

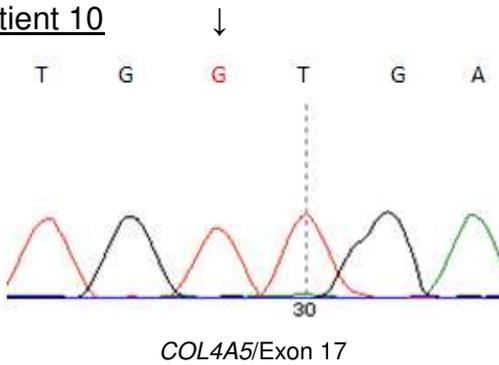


Gen: COL4A3
Exon 26
Nukleotidveränderung: c.1892G>T (h)
AS-Veränderung: p.Gly631Val (h)
Unbekannte Mutation
Art der Sequenzvariation: Missense



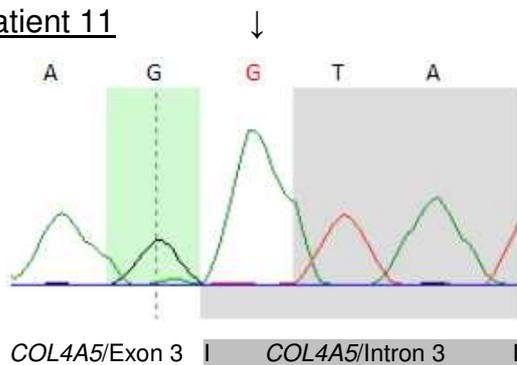
Gen: COL4A3
Exon 52
Nukleotidveränderung: c.4981C>T (h)
AS-Veränderung: p.Arg1661Cys (h)
Bekannt Mutation
Art der Sequenzvariation: Missense

Patient 10



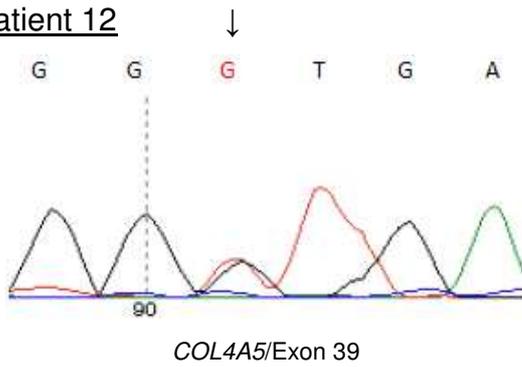
Gen: COL4A5
Exon 17
Nukleotidveränderung: c.965G>T
AS-Veränderung: p.Gly322Val
Unbekannte Mutation
Art der Sequenzvariation: Missense

Patient 11



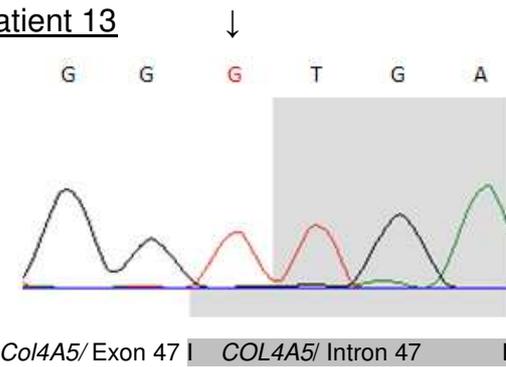
Gen: COL4A5
Intron 3
Nukleotidveränderung: c.231+1G>A (IVS3+1G>A)
Bekannt Mutation
Art der Sequenzvariation: Splice site

Patient 12



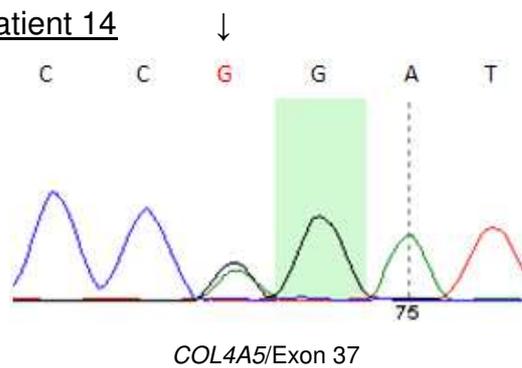
Gen: COL4A5
Exon 39
Nukleotidveränderung: c.3545G>T (h)
AS-Veränderung: p.Gly1182Val (h)
Unbekannte Mutation
Art der Sequenzvariation: Missense

Patient 13



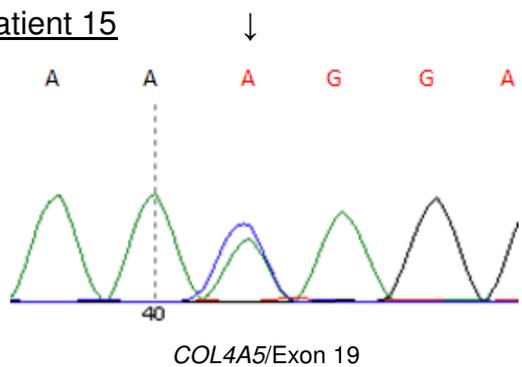
Gen: COL4A5
Intron 47
Nukleotidveränderung: c.4510+1G>T (IVS47+1G>T)
Unbekannte Mutation
Art der Sequenzvariation: Splice site

Patient 14



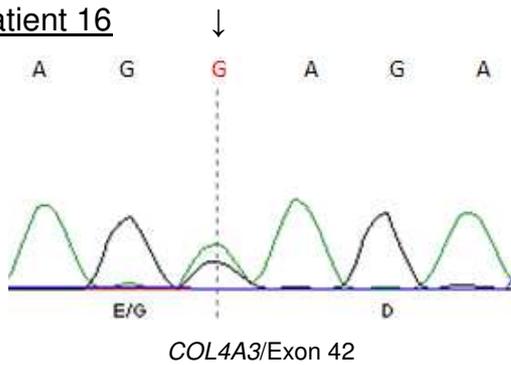
Gen: COL4A5
Exon 37
Nukleotidveränderung: c.3319G>A (h)
AS-Veränderung: p.Gly1107Arg (h)
Bekannte Mutation
Art der Sequenzvariation: Missense

Patient 15



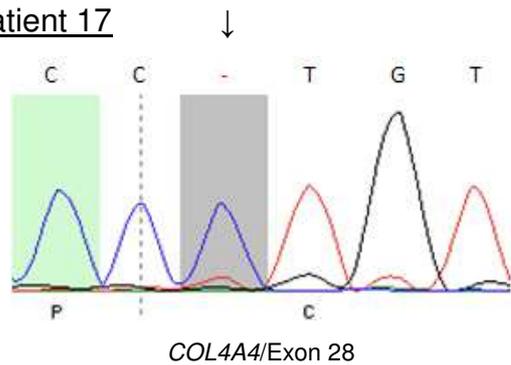
Gen: COL4A5
Exon 19
Nukleotidveränderung: c.1073_1074insC (h)
AS-Veränderung: p.Lys358AsnfsX53 (h)
Unbekannte Mutation
Art der Sequenzvariation: Insertion mit Frameshift

Patient 16



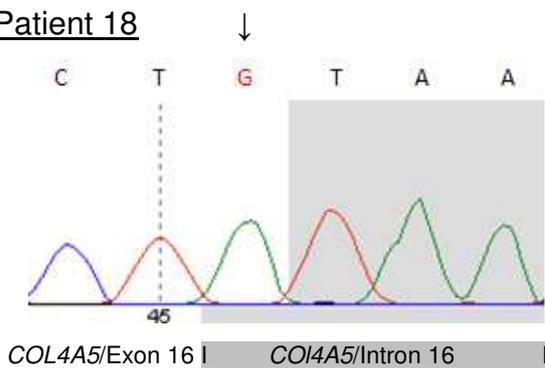
Gen: *COL4A3*
Exon 42
Nukleotidveränderung: c.3575G>A (h)
AS-Veränderung: p.Gly1192Glu (h)
Unbekannte Mutation
Art der Sequenzvariation: Missense

Patient 17



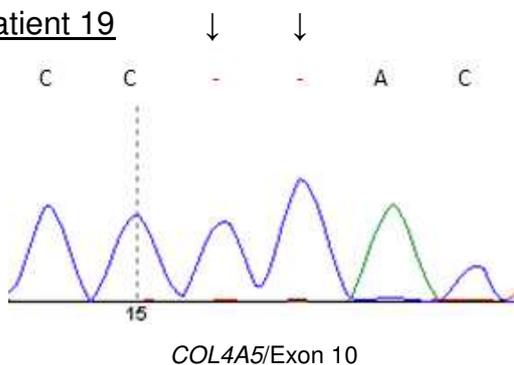
Gen: *COL4A4*
Exon 28
Nukleotidveränderung: c.2219dupC (H)
AS-Veränderung: p.Val741CysfsX47 (H)
Unbekannte Mutation
Art der Sequenzvariation: Duplikation mit Frameshift

Patient 18



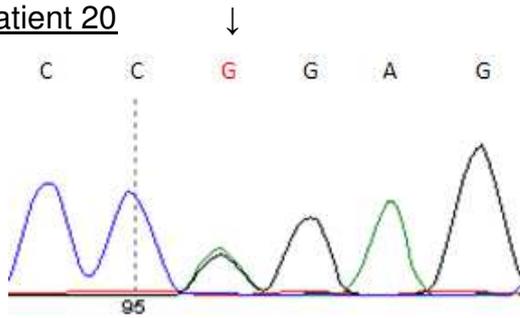
Gen: *COL4A5*
Intron 16
Nukleotidveränderung: c.936+1G>A (IVS16+1G>A)
Unbekannte Mutation
Art der Sequenzvariation: Splice site

Patient 19



Gen: *COL4A5*
Exon 10
Nukleotidveränderung: c.560_561dupCC
AS-Veränderung: p.Thr188ProfsX16
Unbekannte Mutation
Art der Sequenzvariation: Duplikation mit Frameshift

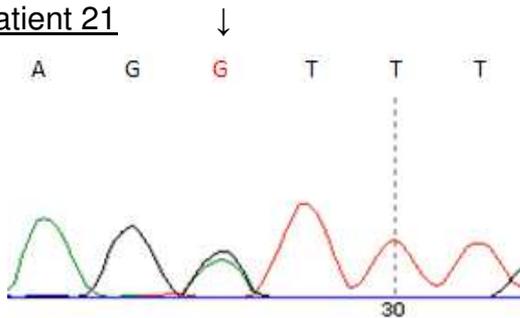
Patient 20



COL4A5/Exon 31

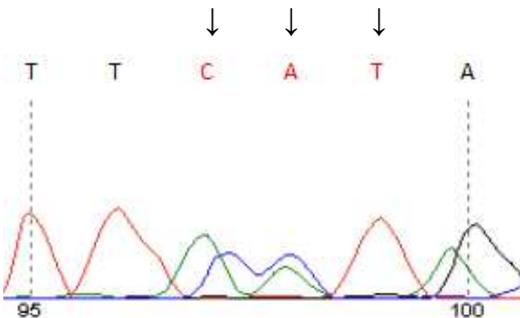
Gen: COL4A5
Exon 31
Nukleotidveränderung: c.2605G>A (h)
AS-Veränderung: p.Gly869Arg (h)
Bekannte Mutation
Art der Sequenzvariation: Missense

Patient 21



COL4A3/Exon 48

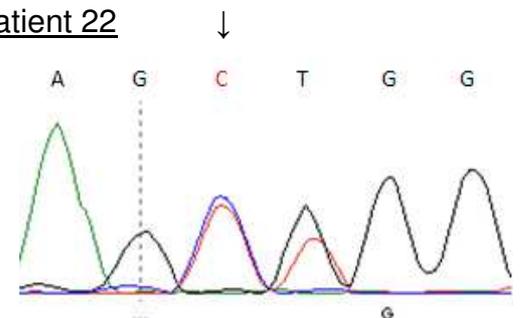
Gen: COL4A3
Exon 48
Nukleotidveränderung: c. 4280G>A (h)
AS-Veränderung: p.Gly1427Asp (h)
Unbekannte Mutation
Art der Sequenzvariation: Missense



COL4A3/Exon 49

Gen: COL4A3
Exon 49
Nukleotidveränderung: c.4559_4561delCAT (h)
AS-Veränderung: p.Ser1520del (h)
Unbekannte Mutation
Art der Sequenzvariation: Deletion

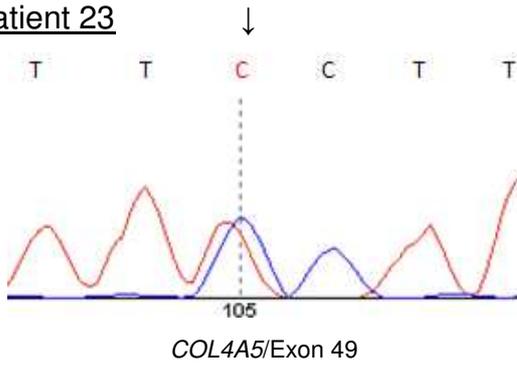
Patient 22



COL4A4/Exon 48

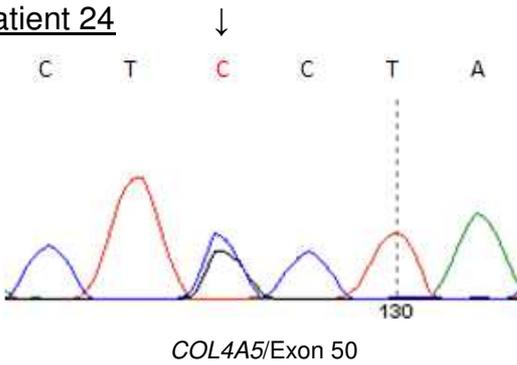
Gen: COL4A4
Exon 48
Nukleotidveränderung: c.4820delC (h)
AS-Veränderung: p.Ala1607ValfsX49 (h)
Unbekannte Mutation
Art der Sequenzvariation: Deletion mit Frameshift

Patient 23



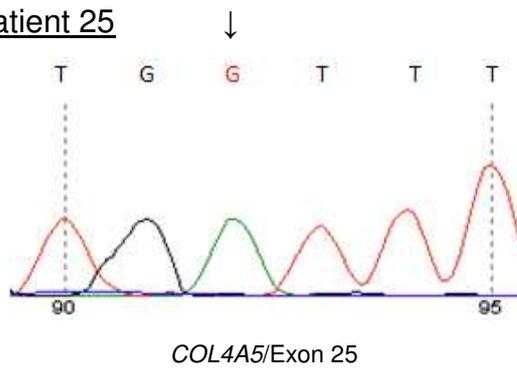
Gen: COL4A5
Exon 49
Nukleotidveränderung: c.4793C>T (h)
AS-Veränderung: p.Ser1598Phe (h)
Unbekannte Mutation
Art der Sequenzvariation: Missense

Patient 24



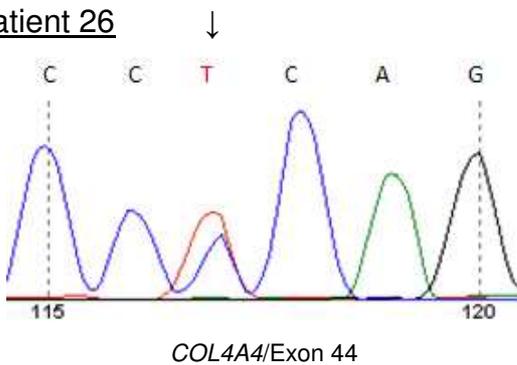
Gen: COL4A5
Exon 50
Nukleotidveränderung: c.4931C>G
AS-Veränderung: p.Ser1644Cys (h)
Unbekannte Mutation
Art der Sequenzvariation: Missense

Patient 25



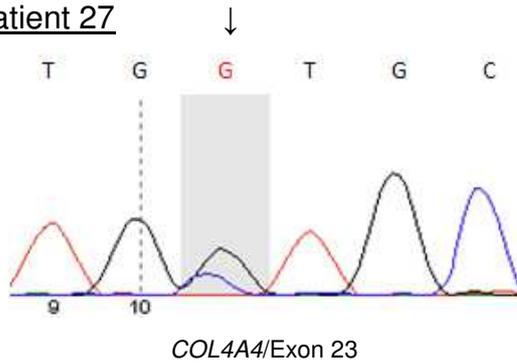
Gen: COL4A5
Exon 25
Nukleotidveränderung: c.1871G>A
AS-Veränderung: p.Gly624Asp
Bekannte Mutation
Art der Sequenzvariation: Missense

Patient 26



Gen: COL4A4
Exon 44
Nukleotidveränderung: c.4208_4209insC (h)
AS-Veränderung: p.Ser1403ProfsX29 (h)
Unbekannte Mutation
Art der Sequenzvariation: Insertion mit Frameshift

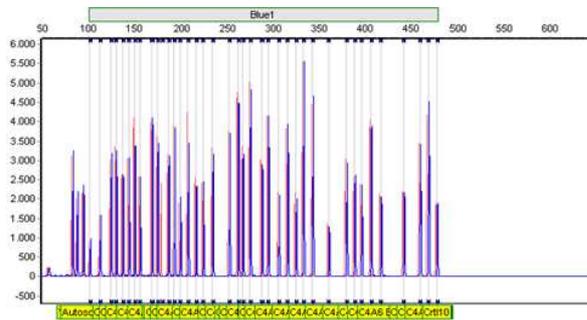
Patient 27



Gen: COL4A4
 Exon 23
 Nukleotidveränderung: c.1634G>C (h)
 AS-Veränderung: p.Gly545Ala (h)
 Unbekannte Mutation
 Art der Sequenzvariation: Missense

Patient 28

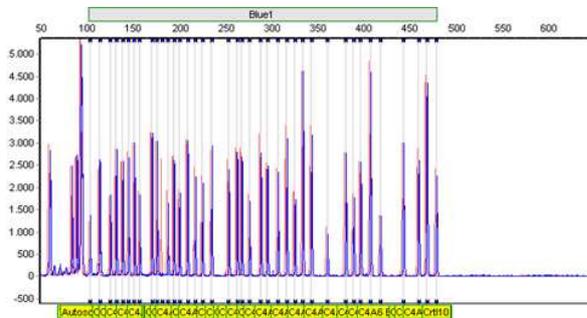
Deletion des gesamten Exons 2, COL4A5



Gen: COL4A5
 Exon 2
 Nukleotidveränderung: Deletion Exon 2
 Methode: MLPA
 Unbekannte Mutation
 Art der Sequenzvariation: Größere Deletion

Patient 29

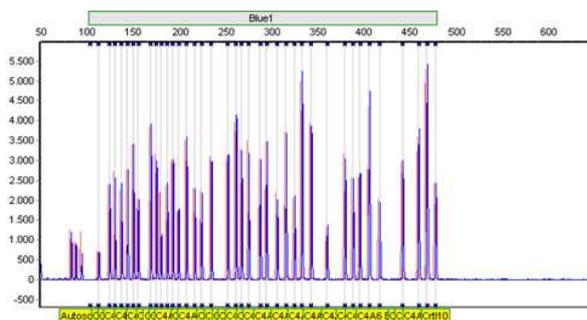
Deletion des gesamten Exons 2, COL4A5



Gen: COL4A5
 Exon 2
 Nukleotidveränderung: Deletion Exon 2
 Methode: MLPA
 Unbekannte Mutation
 Art der Sequenzvariation: Größere Deletion

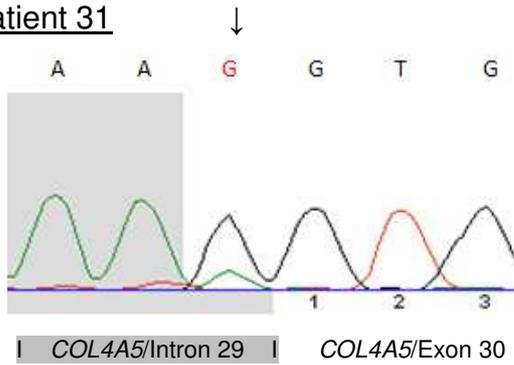
Patient 30

Deletion des gesamten Exons 2, COL4A5



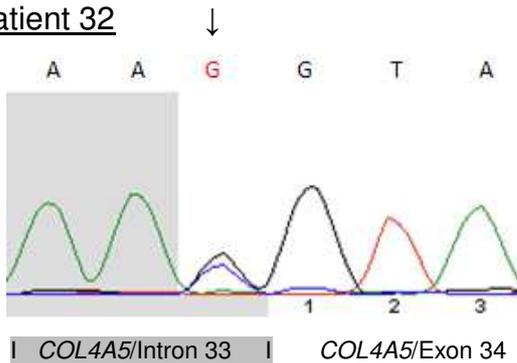
Gen: COL4A5
 Exon 2
 Nukleotidveränderung: Deletion Exon 2
 Methode: MLPA
 Unbekannte Mutation
 Art der Sequenzvariation: Größere Deletion

Patient 31



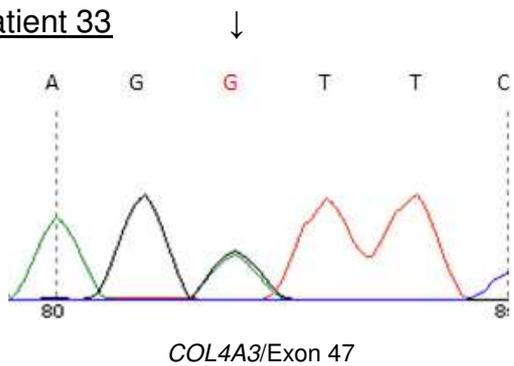
Gen: COL4A5
Intron 29
Nukleotidveränderung: c.2396-1G>A (IVS29-1G>A);
Mosaik: 13-22% der Zellen betroffen
Unbekannte Mutation
Art der Sequenzvariation: Splice site

Patient 32



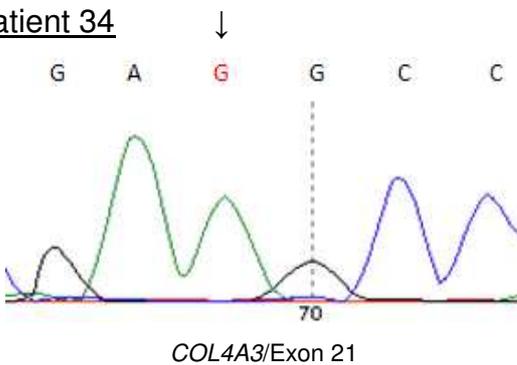
Gen: COL4A5
Intron 33
Nukleotidveränderung: c.2918-1G>C (h)
(IVS33-1G>C) (h)
Unbekannte Mutation
Art der Sequenzvariation: Splice site

Patient 33



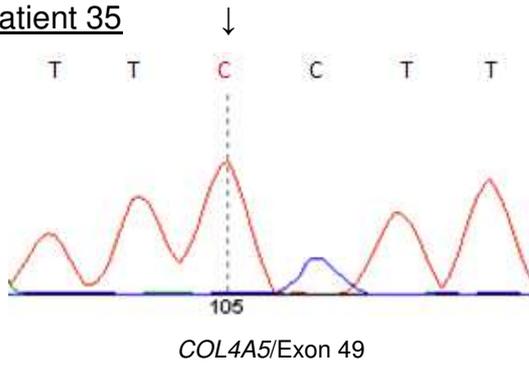
Gen: COL4A3
Exon 47
Nukleotidveränderung: c.4235G>A (h)
AS-Veränderung: p.Gly1412Asp (h)
Unbekannte Mutation
Art der Sequenzvariation: Missense

Patient 34



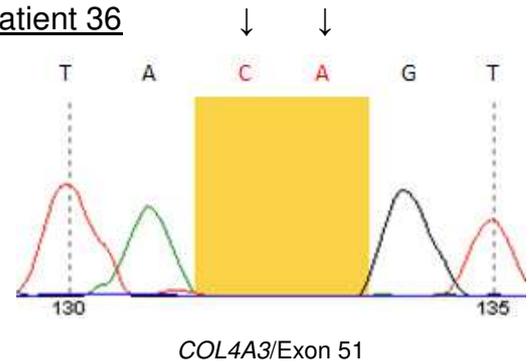
Gen: COL4A3
Exon 21
Nukleotidveränderung: c.1219G>A (H)
AS-Veränderung: p.Gly407Ser (H)
Unbekannte Mutation
Art der Sequenzvariation: Missense

Patient 35



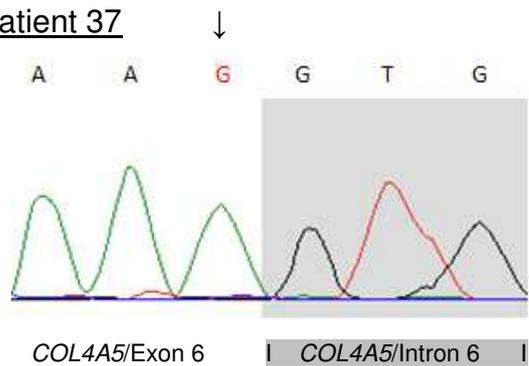
Gen: COL4A5
Exon 49
Nukleotidveränderung: c.4793C>T
AS-Veränderung: p.Ser1598Phe
Unbekannte Mutation
Art der Sequenzvariation: Missense

Patient 36



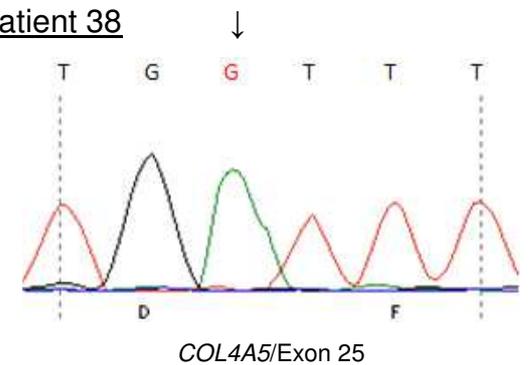
Gen: COL4A3
Exon 51
Nukleotidveränderung: c.4887_4888delCA (H)
AS-Veränderung: p.Tyr1629* (H)
Unbekannte Mutation
Art der Sequenzvariation: Deletion

Patient 37



Gen: COL4A5
Exon 6
Nukleotidveränderung: c.384G>A
AS-Veränderung: p.Lys128Lys
Unbekannte Mutation
Art der Sequenzvariation: Stille Mutation

Patient 38



Gen: COL4A5
Exon 25
Nukleotidveränderung: c.1871G>A
AS-Veränderung: p.Gly624Asp
Bekannt Mutation
Art der Sequenzvariation: Missense

AS, Aminosäure; (h) heterozygot; (H), homozygot; ansonsten hemizygot

3.2 Hämaturie

3.2.1 Mutationen in COL4A5

Zu den Patienten mit Mutationen in *COL4A5* wurden folgende Angaben zur Hämaturie gemacht. 82,4% der Männer und 72,7% der Frauen wiesen eine Hämaturie auf (Tab. 5a):

Pat.	Geschl.	Alter	Häm.	Nukleotidveränderung	AS-Veränderung	Exon/Intron
29	m	2	-	Deletion Exon 2		2
6	m	61	-	c.4895G>A	p.Cys1632Tyr	50
7	m	18	-	c.973G>A	p.Gly325Arg	17
10	m	17	+	c.965G>T	p.Gly322Val	17
4	m	17	+	c.891+9T>G (IVS15+9T>G)		IVS15
28	m	64	++	Deletion Exon 2		2
5	m	51	++	c.4931C>G	p.Ser1644Cys	50
25	m	6	++	c.1871G>A	p.Gly624Asp	25
18	m	12	++	c.936+1G>A (IVS16+1G>A)		IVS16
37	m	7	++	c.384G>A	p.Lys128Lys	6
8	m	16	+++	c.4787G>T	p.Gly1596Val	49
35	m	14	+++	c.4793C>T	p.Ser1598Phe	49
38	m	11	+++	c.1871G>A	p.Gly624Asp	25
19	m	5	+++	c.560_561dupCC	p.Thr188ProfsX16	10
3	m	15	+++	c.4688+1G>A (IVS48+1G>A)		IVS48
11	m	34	+++	c.231+1G>A (IVS3+1G>A)		IVS03
13	m	8	+++	c.4510+1G>T (IVS47+1G>T)		IVS47
14	w	5	-	c.3319G>A (h)	p.Gly1107Arg (h)	37
24	w	31	-	c.4931C>G (h)	p.Ser1644Cys (h)	50
15	w	10	-	c.1073_1074insC (h)	p.Lys358AsnfsX53 (h)	19
2	w	17	+	c.1165G>A (h)	p.Gly389Arg (h)	19
12	w	55	+	c.3545G>T (h)	p.Gly1182Val (h)	39
32	w	29	+	c.2918-1G>C (IVS33-1G>C) (h)		IVS33
1	w	39	++	c.973G>A (h)	p.Gly325Arg (h)	17
20	w	6	++	c.2605G>A (h)	p.Gly869Arg (h)	31
23	w	10	++	c.4793C>T (h)	p.Ser1598Phe (h)	49
31	w	46	++	c.2396-1G>A (IVS29-1G>A); Mosaik 13-22%		IVS29
30	w	27	+++	Deletion Exon 2 (h)		2

Tab. 5a: Hämaturie bei Mutationen in *COL4A5*

Alter in Jahren; w, weiblich (hell schraffiert); m, männlich (dunkel schraffiert); (h) heterozygot; (H), homozygot; ansonsten hemizygot; gelb markiert sind Patienten, bei denen eine Hämaturie isoliert auftritt

In **Abb. 13** sind die Angaben zur Hämaturie von Frauen und Männern grafisch dargestellt. Dies macht nochmals deutlich, dass Männer öfter und stärker von Hämaturie betroffen sind als Frauen (**Abb. 13**). 41,2% der Männer wiesen eine ausgeprägte Hämaturie von +++ auf, aber auch eine Frau, bei der es sich um eine 27-jährige Patientin handelt und die eine Deletion von Exon 2 im *COL4A5*-Gen hat,

weist eine ausgeprägte Hämaturie von +++ auf. Die Deletion befindet sich am 5'-Ende des Gens. Obwohl Hämaturie als Leitsymptom des Alport-Syndroms bezeichnet wird, zeigen 21,4% der Patienten keine Hämaturie. Hierbei handelt es sich um vier pädiatrische Patienten sowie einen adult weiblichen und einen adult männlichen Patienten. Das mittlere Alter der Patienten ohne Hämaturie beträgt 21,2 Jahre. Der adult männliche ist ein 61-jähriger Patient mit einer Mutation in Exon 50, also am 3'-Ende des Gens.

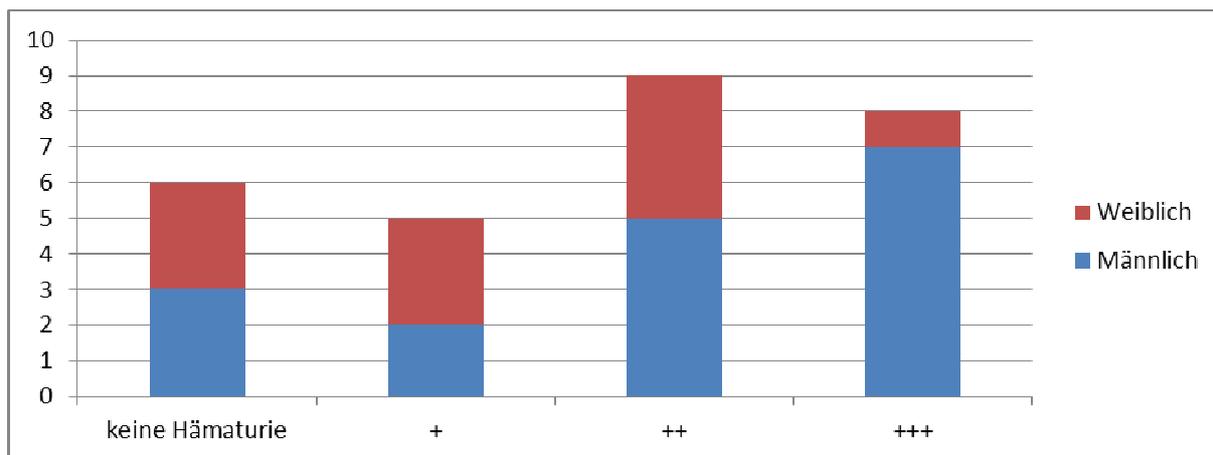


Abb. 13: Hämaturie bei Mutationen in COL4A5

Das Symptom Hämaturie trat bei 5 Patienten, welche in **Tab. 5a** gelb markiert sind und in **Tab. 5b** separat dargestellt sind, isoliert auf (Pat. 10, 25, 30, 37, 38):

Pat.	Geschl.	Alter	Häm.	Nukleotidveränderung	AS-Veränderung	Exon
10	m	17	+	c.965G>T	p.Gly322Val	17
25	m	6	++	c.1871G>A	p.Gly624Asp	25
37	m	7	++	c.384G>A	p.Lys128Lys	6
38	m	11	+++	c.1871G>A	p.Gly624Asp	25
30	w	27	+++	Deletion Exon 2 (h)		2

Tab. 5b: Isolierte Hämaturie bei Mutationen in COL4A5

Alter in Jahren; w, weiblich (hell schraffiert); m, männlich (dunkel schraffiert); (h) heterozygot; ansonsten hemizygot

Auffällig ist, dass Patienten eine isolierte und sehr ausgeprägte Hämaturie aufweisen können, ohne sonst weitere Symptome des Alport-Syndroms zu haben. Bei Patient 37 handelt es sich um eine stille Mutation, die zu keinem Austausch der Aminosäure führt. Es ist dennoch davon auszugehen, dass diese Mutation zu einem aberranten Spleißen führt, da auch die Mutter unter einem Alport-Syndrom leidet und das Vorhersage-Programm SpliceView ein verändertes Spleißen vorhersagt. Bei Patient 30 konnte eine Deletion des gesamten Exons 2 nachgewiesen werden. Bei allen

anderen Patienten mit isolierter Hämaturie handelt es sich um Missense-Mutationen, dabei ausschließlich um Glycin-Mutationen. Patient 25 und Patient 38 sind Patienten, die exakt dieselbe Mutation aufweisen, aber nicht miteinander verwandt sind. Die Mutation wurde bereits mehrfach in der Literatur beschrieben (Martin et al. 1998). Die Mutationen befinden sich eher am 5'-Ende des Gens befinden.

3.2.2 Mutationen in *COL4A4*

Bei den Patienten mit Mutationen in *COL4A4* weist der einzige männliche Patient bereits im Alter von 10 Jahren eine Hämaturie von +++ auf (Pat. 26). Es handelt sich bei ihm um eine isolierte Hämaturie. Der Patient weist sonst keine weiteren Symptome des Alport-Syndroms auf. Sämtliche weibliche Patienten geben Hämaturie als eines der Symptome an. Auch bei einem weiblichen Patienten tritt die Hämaturie isoliert auf (Pat. 22). Beide Patienten mit isolierter Hämaturie (Pat. 26 und 22) haben Mutationen am 3'-Ende des Gens. In beiden Fällen handelt es sich um Frameshift-Mutationen, die mit einem vorzeitigen Proteinkettenabbruch einhergehen (Tab. 6).

Pat.	Geschl.	Alter	Häm.	Nukleotidveränderung	AS-Veränderung	Exon/Intron
26	m	10	+++	c.4208_4209insC (h)	p.Ser1403ProfsX29 (h)	44
27	w	33	+	c.1634G>C (h)	p.Gly545Ala (h)	23
17	w	15	+	c.2219dupC (H)	p.Val741CysfsX47 (H)	28
22	w	5	++	c.4820delC (h)	p.Ala1607ValfsX49 (h)	48

Tab. 6: Hämaturie bei Mutationen in *COL4A4*

Alter in Jahren; w, weiblich (hell schraffiert); m, männlich (dunkel schraffiert); (h) heterozygot; (H), homozygot; gelb markiert sind Patienten, bei denen das Symptom Hämaturie isoliert auftritt

3.2.3 Mutationen in *COL4A3*

Von den Patienten mit Mutationen in *COL4A3* geben sämtliche männliche Patienten eine Hämaturie von mindestens ++ an. Ein 8-jähriger Patient mit einer Mutation in Exon 51 in *COL4A3* weist sogar eine Hämaturie von +++ auf. Lediglich bei einer weiblichen Patientin im Alter von 10 Jahren konnte keine Hämaturie nachgewiesen werden. Es besteht - bei dieser kleinen Fallzahl - kein Hinweis auf eine Genotyp-Phänotyp-Korrelation. Die Hämaturie trat bei keinem der Patienten isoliert auf. Sie war immer mit mindestens einem weiteren Symptom des Alport-Syndroms assoziiert (Tab. 7).

Pat.	Geschl.	Alter	Häm.	Nukleotidveränderung	AS-Veränderung	Exon
33	m	33	++	c.4235G>A (h)	p.Gly1412Asp (h)	47
34	m	26	++	c.1219G>A (H)	p.Gly407Ser (H)	21
36	m	8	+++	c.4887_4888delCA (H)	p.Tyr1629* (H)	51
21	w	10	-	c.4280G>A (h)	p.Gly1427Asp (h)	48
				c.4559_4561delCAT (h)	p.Ser1520del (h)	49
16	w	5	++	c.3575G>A (h)	p.Gly1192Glu (h)	42
9	w	34	++	c.1892G>T (h)	p.Gly631Val (h)	26
				c.4981C>T (h)	p.Arg1661Cys (h)	52

Tab. 7: Hämaturie bei Mutationen in *COL4A3*

Alter in Jahren; w, weiblich (hell schraffiert); m, männlich (dunkel schraffiert); (h) heterozygot; (H), homozygot

3.3 Proteinurie

3.3.1 Mutationen in *COL4A5*

64,7% der Männer mit Mutationen in *COL4A5* und 72,7% der Frauen haben eine Proteinurie. Nur eine Patientin hatte keine Hämaturie und keine Proteinurie (Pat. 24). Es handelt sich um eine 31-jährige Patientin mit einer Mutation am 3'-Ende des Gens. Auch bei einem männlichen Patienten konnte weder eine Hämaturie noch eine Proteinurie nachgewiesen werden (Pat. 29). Hierbei handelt es sich um einen 2-jährigen Jungen mit einer Deletion von Exon 2. Es ist sehr wahrscheinlich, dass die Symptome im Lauf der Erkrankung noch auftreten werden. Bei insgesamt 35,3% der Männer konnte keine Proteinurie nachgewiesen werden. Dem gegenüber stehen 27,3% der Frauen. 17,6% der Männer haben eine ausgeprägte Proteinurie von +++, aber keine der Frauen (**Abb. 14**). Die Patienten, die eine ausgeprägte Proteinurie aufweisen, zeigen in der Regel auch eine ausgeprägte Hämaturie. So haben die Patienten 3 und 11 sowohl eine Proteinurie als auch eine Hämaturie von +++. Patient 5, bei dem auch eine Proteinurie von +++ vorliegt, hat eine Hämaturie von ++. Nichtsdestotrotz trat bei zwei Patienten eine isolierte Proteinurie auf (Pat. 14, 15). Diese beiden Patienten weisen eine Frameshift-Mutation in Exon 19 bzw. eine Missense-Mutation in Exon 37 auf. In vorliegendem Patientenkollektiv besteht bezüglich der Proteinurie kein Hinweis auf eine Genotyp-Phänotyp-Korrelation (**Tab. 8**).

- Ergebnisse -

Pat.	Geschl.	Alter	Prot.	Nukleotidveränderung	AS-Veränderung	Exon/Intron
29	m	2	-	Deletion Exon 2		2
10	m	17	-	c.965G>T	p.Gly322Val	17
4	m	17	-	c.891+9T>G (IVS15+9T>G)		IVS15
25	m	6	-	c.1871G>A	p.Gly624Asp	25
37	m	7	-	c.384G>A	p.Lys128Lys	6
38	m	11	-	c.1871G>A	p.Gly624Asp	25
7	m	18	+	c.973G>A	p.Gly325Arg	17
6	m	61	+	c.4895G>A	p.Cys1632Tyr	50
18	m	12	+	c.936+1G>A (IVS16+1G>A)		IVS16
19	m	5	+	c.560_561dupCC	p.Thr188ProfsX16	10
28	m	64	++	Deletion Exon 2		2
8	m	16	++	c.4787G>T	p.Gly1596Val	49
35	m	14	++	c.4793C>T	p.Ser1598Phe	49
13	m	8	++	c.4510+1G>T (IVS47+1G>T)		IVS47
5	m	51	+++	c.4931C>G	p.Ser1644Cys	50
3	m	15	+++	c.4688+1G>A (IVS48+1G>A)		IVS48
11	m	34	+++	c.231+1G>A (IVS3+1G>A)		IVS03
24	w	31	-	c.4931C>G (h)	p.Ser1644Cys (h)	50
31	w	46	-	c.2396-1G>A (IVS29-1G>A); Mosaik 13-22%		IVS29
30	w	27	-	Deletion Exon 2 (h)		2
1	w	39	+	c.973G>A (h)	p.Gly325Arg (h)	17
14	w	5	++	c.3319G>A (h)	p.Gly1107Arg (h)	37
15	w	10	++	c.1073_1074insC (h)	p.Lys358AsnfsX53 (h)	19
2	w	17	++	c.1165G>A (h)	p.Gly389Arg (h)	19
12	w	55	++	c.3545G>T (h)	p.Gly1182Val (h)	39
32	w	29	++	c.2918-1G>C (IVS33-1G>C) (h)		IVS33
20	w	6	++	c.2605G>A (h)	p.Gly869Arg (h)	31
23	w	10	++	c.4793C>T (h)	p.Ser1598Phe (h)	49

Tab. 8: Proteinurie bei Mutationen in *COL4A5*

Alter in Jahren; w, weiblich (hell schraffiert); m, männlich (dunkel schraffiert); (h) heterozygot; ansonsten hemizygot; gelb markiert sind Patienten, bei denen eine Proteinurie isoliert auftritt

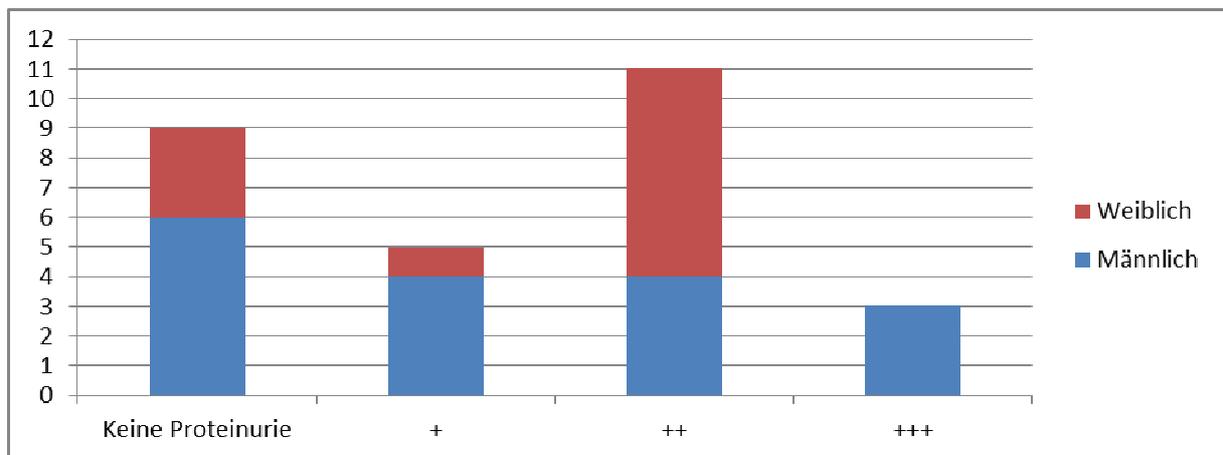


Abb. 14: Proteinurie bei Mutationen in *COL4A5*

3.3.2 Mutationen in COL4A4

Bei den Patienten mit Mutationen in *COL4A4* wies der einzige männliche Patient keine Proteinurie auf. Es handelt sich bei diesem Patienten um einen 10-jährigen Jungen mit einer Frameshift-Mutation in Exon 44. Zwei von drei Frauen wiesen eine Proteinurie auf. Beide hatten Mutationen in der Mitte des Gens. Bei keiner der Frauen trat die Proteinurie isoliert auf (**Tab. 9**).

Pat.	Geschl.	Alter	Prot.	Nukleotidveränderung	AS-Veränderung	Exon
26	m	10	-	c.4208_4209insC (h)	p.Ser1403ProfsX29 (h)	44
22	w	5	-	c.4820delC (h)	p.Ala1607ValfsX49 (h)	48
27	w	33	++	c.1634G>C (h)	p.Gly545Ala (h)	23
17	w	15	++	c.2219dupC (H)	p.Val741CysfsX47 (H)	28

Tab. 9: Proteinurie bei Mutationen in *COL4A4*

Alter in Jahren; w, weiblich (hell schraffiert); m, männlich (dunkel schraffiert); (h) heterozygot; (H), homozygot

3.3.3 Mutationen in COL4A3

Sämtliche Patienten mit Mutationen in *COL4A3* wiesen eine Proteinurie von ++ auf. Bei keinem der Patienten trat die Proteinurie isoliert auf. Sie war immer mit anderen Symptomen des Alport-Syndroms assoziiert (**Tab. 10**).

Pat.	Geschl.	Alter	Prot.	Nukleotidveränderung	AS-Veränderung	Exon
33	m	33	++	c.4235G>A (h)	p.Gly1412Asp (h)	47
34	m	26	++	c.1219G>A (H)	p.Gly407Ser (H)	21
36	m	8	++	c.4887_4888delCA (H)	p.Tyr1629* (H)	51
21	w	10	++	c.4280G>A (h)	p.Gly1427Asp (h)	48
				c.4559_4561delCAT (h)	p.Ser1520del (h)	49
16	w	5	++	c.3575G>A (h)	p.Gly1192Glu (h)	42
9	w	34	++	c.1892G>T (h)	p.Gly631Val (h)	26
				c.4981C>T (h)	p.Arg1661Cys (h)	52

Tab. 10: Proteinurie bei Mutationen in *COL4A3*

Alter in Jahren; w, weiblich (hell schraffiert); m, männlich (dunkel schraffiert); (h) heterozygot; (H), homozygot

3.4 Hörstörungen

3.4.1 Mutationen in COL4A5

Von den Patienten mit Mutationen in *COL4A5* litten 25% (7 Patienten) an einer Schwerhörigkeit, davon vier männliche und drei weibliche. Drei von vier männlichen

Patienten mit Schwerhörigkeit hatten eine Mutation am 3'-Ende des Gens. Nur bei einem Patienten befand sich die Mutation am 5'-Ende des Gens. Die drei weiblichen Patienten mit Schwerhörigkeit hatten alle Mutationen in der Mitte des Gens. Bei Patientin 20 handelt es sich um ein 6-jähriges Mädchen, welches bereits postpartal eine Schwerhörigkeit aufwies, was für das Alport-Syndrom eher untypisch ist. Sowohl die Mutter, als auch die Großeltern mütterlichseits der Patientin, leiden bzw. litten an Schwerhörigkeit. Bei der genetischen Untersuchung wurde sowohl bei der Mutter als auch bei dem Mädchen eine Mutation im Gen *MYH9* nachgewiesen. Mutationen in *MYH9* führen generell zu Alport-ähnlichen Symptomen, unter anderem auch zu Schwerhörigkeit. Bei der Patientin selbst konnte zusätzlich die Mutation in *COL4A5* nachgewiesen werden. Es ist aber davon auszugehen, dass die Schwerhörigkeit aufgrund der Mutation in *MYH9*, die auch bei der Mutter vorliegt, aufgetreten ist. Somit weisen im Endeffekt im Patientenkollektiv nur 21,4% der Patienten mit Mutationen in *COL4A5* eine Alport-bedingte Schwerhörigkeit auf. Sämtliche Patienten mit Schwerhörigkeit wiesen auch andere Symptome des Alport-Syndroms auf. Die Schwerhörigkeit trat nie isoliert auf (**Tab. 11**). Sie ist immer mit weiteren Symptomen des Alport-Syndroms assoziiert und als Spätsymptom des Alport-Syndroms zu betrachten.

- Ergebnisse -

Pat.	Geschl.	Alter	Hörstörung	Nukleotidveränderung	AS-Veränderung	Exon/Intron
29	m	2	-	Deletion Exon 2		2
10	m	17	-	c.965G>T	p.Gly322Val	17
25	m	6	-	c.1871G>A	p.Gly624Asp	25
37	m	7	-	c.384G>A	p.Lys128Lys	6
38	m	11	-	c.1871G>A	p.Gly624Asp	25
18	m	12	-	c.936+1G>A (IVS16+1G>A)		IVS16
19	m	5	-	c.560_561dupCC	p.Thr188ProfsX16	10
35	m	14	-	c.4793C>T	p.Ser1598Phe	49
13	m	8	-	c.4510+1G>T (IVS47+1G>T)		IVS47
7	m	18	-	c.973G>A	p.Gly325Arg	17
4	m	17	-	c.891+9T>G (IVS15+9T>G)		IVS15
5	m	51	-	c.4931C>G	p.Ser1644Cys	50
11	m	34	-	c.231+1G>A (IVS3+1G>A)		IVS03
6	m	61	Schwerhörigkeit	c.4895G>A	p.Cys1632Tyr	50
8	m	16	Schwerhörigkeit	c.4787G>T	p.Gly1596Val	49
3	m	15	Schwerhörigkeit	c.4688+1G>A (IVS48+1G>A)		IVS48
28	m	64	Schwerhörigkeit	Deletion Exon 2		2
24	w	31	-	c.4931C>G (h)	p.Ser1644Cys (h)	50
30	w	27	-	Deletion Exon 2 (h)		2
1	w	39	-	c.973G>A (h)	p.Gly325Arg (h)	17
14	w	5	-	c.3319G>A (h)	p.Gly1107Arg (h)	37
15	w	10	-	c.1073_1074insC (h)	p.Lys358AsnfsX53 (h)	19
32	w	29	-	c.2918-1G>C (IVS33-1G>C) (h)		IVS33
23	w	10	-	c.4793C>T (h)	p.Ser1598Phe (h)	49
2	w	17	-	c.1165G>A (h)	p.Gly389Arg (h)	19
12	w	55	Schwerhörigkeit	c.3545G>T (h)	p.Gly1182Val (h)	39
31	w	46	Schwerhörigkeit	c.2396-1G>A (IVS29-1G>A); Mosaik 13-22%		IVS29
20	w	6	Schwerhörigkeit postpartal	c.2605G>A (h)	p.Gly869Arg (h)	31

Tab. 11: Hörstörung bei Mutationen in *COL4A5*, braun markiert Patientin mit zusätzlicher Mutation in *MYH9*; Alter in Jahren; w, weiblich (hell schraffiert); m, männlich (dunkel schraffiert); (h) heterozygot; ansonsten hemizygot

3.4.2 Mutationen in *COL4A4*

Eine 15-jährige Patientin mit Mutation in *COL4A4* wies eine Schwerhörigkeit auf. Die Mutation befand sich in Exon 28 (**Tab. 12**). Die Patientin hat außerdem eine Hämaturie von +, eine Proteinurie von ++ und eine Ptosis links.

Pat.	Geschl.	Alter	Hörstörung	Nukleotidveränderung	AS-Veränderung	Exon
26	m	10	-	c.4208_4209insC (h)	p.Ser1403ProfsX29 (h)	44
22	w	5	-	c.4820delC (h)	p.Ala1607ValfsX49 (h)	48
27	w	33	-	c.1634G>C (h)	p.Gly545Ala (h)	23
17	w	15	Schwerhörigkeit	c.2219dupC (H)	p.Val741CystsX47 (H)	28

Tab. 12: Hörstörung bei Mutationen in *COL4A4*
Alter in Jahren; w, weiblich (hell schraffiert); m, männlich (dunkel schraffiert); (h) heterozygot; (H), homozygot

3.4.3 Mutationen in *COL4A3*

Ein 8-jähriger Patient mit Mutation am 3'-Ende des Gens *COL4A3* litt unter Schwerhörigkeit. Eine 34-jährige Patientin, die sowohl eine Mutation am 3'-Ende des Gens, als auch in der Mitte des Gens hatte, wies eine Schwerhörigkeit auf (**Tab. 13**).

Pat.	Geschl.	Alter	Hörstörung	Nukleotidveränderung	AS-Veränderung	Exon
33	m	33	-	c.4235G>A (h)	p.Gly1412Asp (h)	47
34	m	26	-	c.1219G>A (H)	p.Gly407Ser (H)	21
36	m	8	Schwerhörigkeit	c.4887_4888delCA (H)	p.Tyr1629* (H)	51
21	w	10	-	c.4280G>A (h)	p.Gly1427Asp (h)	48
				c.4559_4561delCAT (h)	p.Ser1520del (h)	49
16	w	5	-	c.3575G>A (h)	p.Gly1192Glu (h)	42
9	w	34	Schwerhörigkeit	c.1892G>T (h)	p.Gly631Val (h)	26
				c.4981C>T (h)	p.Arg1661Cys (h)	52

Tab. 13: Hörstörung bei Mutationen in *COL4A3*

Alter in Jahren; w, weiblich (hell schraffiert); m, männlich (dunkel schraffiert); (h) heterozygot; (H), homozygot

3.5 Augenveränderungen

3.5.1 Mutationen in *COL4A5*

Lediglich ein männlicher und ein weiblicher Patient mit Mutation in *COL4A5* wiesen Augenveränderungen auf. Bei dem 64-jährigen Patienten hat sich neben der Proteinurie, der Hämaturie und der Schwerhörigkeit klinisch eine Visusminderung bemerkbar gemacht. Außerdem leidet dieser Patient an einer therapiebedürftigen Hypertonie. Die ausgeprägte Symptomatik kann einerseits dadurch bedingt sein, dass sich die Mutation am 5'-Ende befindet und es sich um die Deletion eines ganzen Exons handelt (Exon 2), andererseits drückt sich im fortgeschrittenen Alter bei diesem Patienten das volle klinische Erscheinungsbild des Alport-Syndroms aus. Die zweite Patientin ist eine 46-Jährige mit Myopie. Diese ist wahrscheinlich nicht auf das Alport-Syndrom zurückzuführen (**Tab. 14**).

- Ergebnisse -

Pat.	Geschl.	Alter	Augenveränderung	Nukleotidveränderung	AS-Veränderung	Exon/Intron
29	m	2	-	Deletion Exon 2		2
7	m	18	-	c.973G>A	p.Gly325Arg	17
10	m	17	-	c.965G>T	p.Gly322Val	17
4	m	17	-	c.891+9T>G (IVS15+9T>G)		IVS15
25	m	6	-	c.1871G>A	p.Gly624Asp	25
37	m	7	-	c.384G>A	p.Lys128Lys	6
38	m	11	-	c.1871G>A	p.Gly624Asp	25
6	m	61	-	c.4895G>A	p.Cys1632Tyr	50
18	m	12	-	c.936+1G>A (IVS16+1G>A)		IVS16
19	m	5	-	c.560_561dupCC	p.Thr188ProfsX16	10
35	m	14	-	c.4793C>T	p.Ser1598Phe	49
13	m	8	-	c.4510+1G>T (IVS47+1G>T)		IVS47
5	m	51	-	c.4931C>G	p.Ser1644Cys	50
11	m	34	-	c.231+1G>A (IVS3+1G>A)		IVS03
8	m	16	-	c.4787G>T	p.Gly1596Val	49
3	m	15	-	c.4688+1G>A (IVS48+1G>A)		IVS48
28	m	64	Visusminderung	Deletion Exon 2		2
24	w	31	-	c.4931C>G (h)	p.Ser1644Cys (h)	50
30	w	27	-	Deletion Exon 2 (h)		2
1	w	39	-	c.973G>A (h)	p.Gly325Arg (h)	17
14	w	5	-	c.3319G>A (h)	p.Gly1107Arg (h)	37
15	w	10	-	c.1073_1074insC (h)	p.Lys358AsnfsX53 (h)	19
2	w	17	-	c.1165G>A (h)	p.Gly389Arg (h)	19
12	w	55	-	c.3545G>T (h)	p.Gly1182Val (h)	39
32	w	29	-	c.2918-1G>C (IVS33-1G>C) (h)		IVS33
23	w	10	-	c.4793C>T (h)	p.Ser1598Phe (h)	49
20	w	6	-	c.2605G>A (h)	p.Gly869Arg (h)	31
31	w	46	Myopie	c.2396-1G>A (IVS29-1G>A); Mosaik 13-22%		IVS29

Tab. 14: Augenveränderungen bei Mutationen in *COL4A5*

Alter in Jahren; w, weiblich (hell schraffiert); m, männlich (dunkel schraffiert); (h) heterozygot; ansonsten hemizygot

3.5.2 Mutationen in *COL4A4*

Von den Patienten mit Mutationen in *COL4A4* wies eine Patientin im Alter von 15 Jahren eine Augenveränderung im Sinne einer Ptosis links bei unauffälligem Befund rechts auf. Die Mutation befand sich bei dieser Patientin in Exon 28 (**Tab. 15**).

Pat.	Geschl.	Alter	Augenveränderung	Nukleotidveränderung	AS-Veränderung	Exon
26	m	10	-	c.4208_4209insC (h)	p.Ser1403ProfsX29 (h)	44
22	w	5	-	c.4820delC (h)	p.Ala1607ValfsX49 (h)	48
27	w	33	-	c.1634G>C (h)	p.Gly545Ala (h)	23
17	w	15	Ptosis li. sonst opB.	c.2219dupC (H)	p.Val741CysfsX47 (H)	28

Tab. 15: Augenveränderungen bei Mutationen in *COL4A4*

Alter in Jahren; w, weiblich (hell schraffiert); m, männlich (dunkel schraffiert); (h) heterozygot; (H), homozygot

3.5.3 Mutationen in *COL4A3*

Von den Patienten mit Mutationen in *COL4A3* wies ein 33-jähriger Patient einen Keratokonus auf. Der Patient hatte außerdem eine Hämaturie von ++, eine Proteinurie von ++ und einen therapiebedürftigen Hypertonus. Die Mutation befand sich in Exon 47 und somit eher am 3'-Ende des Gens (**Tab. 16**).

Pat.	Geschl.	Alter	Augenveränderung	Nukleotidveränderung	AS-Veränderung	Exon
34	m	26	-	c.1219G>A (H)	p.Gly407Ser (H)	21
36	m	8	-	c.4887_4888delCA (H)	p.Tyr1629* (H)	51
33	m	33	Keratokonus	c.4235G>A (h)	p.Gly1412Asp (h)	47
21	w	10	-	c.4280G>A (h)	p.Gly1427Asp (h)	48
				c.4559_4561delCAT (h)	p.Ser1520del (h)	49
16	w	5	-	c.3575G>A (h)	p.Gly1192Glu (h)	42
9	w	34	-	c.1892G>T (h)	p.Gly631Val (h)	26
				c.4981C>T (h)	p.Arg1661Cys (h)	52

Tab. 16: Augenveränderungen bei Mutationen in *COL4A3*

Alter in Jahren; w, weiblich (hell schraffiert); m, männlich (dunkel schraffiert); (h) heterozygot; (H), homozygot

3.6 Hypertonie

3.6.1 Mutationen in *COL4A5*

Von den Patienten mit Mutationen in *COL4A5* wurde bei 39,3% eine therapiebedürftige Hypertonie diagnostiziert. Von den Männern wurden 47,1%, von den Frauen 27,3% mit Antihypertensiva therapiert. Das mittlere Alter der Patienten mit Hypertonie betrug 35,8 Jahre. Sämtliche Patienten mit Hypertonie wiesen auch andere Symptome des Alport-Syndroms auf (Hämaturie und/oder Proteinurie). In **Tab. 17** wird deutlich, dass nicht nur ältere Patienten eine Hypertonie aufweisen, sondern dass sich im Patientenkollektiv auch jüngere Patienten (Alter < 50 Jahre) mit Hypertonie befinden. 63,6% der Patienten mit Hypertonie waren unter 50 Jahre alt (**Tab.17a**). Patienten, die unter 50 Jahre alt sind und antihypertensiv behandelt werden, wurden in **Tab. 17a** rosa markiert und noch einmal separat in **Tab. 17b** dargestellt. Es kommen sowohl Mutationen am 3'-Ende des Gens, als auch am 5'-Ende des Gens vor. Es handelt sich lediglich um Glycin- und Intron-Mutationen (Splice site-Mutationen und bei Pat. 4 um eine +9 Mutation im Intron) (**Tab. 17b**).

- Ergebnisse -

Pat.	Geschl.	Alter	Hypertonie	Nukleotidveränderung	AS-Veränderung	Exon/Intron
29	m	2	-	Deletion Exon 2		2
10	m	17	-	c.965G>T	p.Gly322Val	17
25	m	6	-	c.1871G>A	p.Gly624Asp	25
37	m	7	-	c.384G>A	p.Lys128Lys	6
38	m	11	-	c.1871G>A	p.Gly624Asp	25
18	m	12	-	c.936+1G>A (IVS16+1G>A)		IVS16
19	m	5	-	c.560_561dupCC	p.Thr188ProfsX16	10
35	m	14	-	c.4793C>T	p.Ser1598Phe	49
13	m	8	-	c.4510+1G>T (IVS47+1G>T)		IVS47
7	m	18	therapiebedürftig	c.973G>A	p.Gly325Arg	17
4	m	17	therapiebedürftig	c.891+9T>G (IVS15+9T>G)		IVS15
6	m	61	therapiebedürftig	c.4895G>A	p.Cys1632Tyr	50
5	m	51	therapiebedürftig	c.4931C>G	p.Ser1644Cys	50
11	m	34	therapiebedürftig	c.231+1G>A (IVS3+1G>A)		IVS3
8	m	16	therapiebedürftig	c.4787G>T	p.Gly1596Val	49
3	m	15	therapiebedürftig	c.4688+1G>A (IVS48+1G>A)		IVS48
28	m	64	therapiebedürftig	Deletion Exon 2		2
24	w	31	-	c.4931C>G (h)	p.Ser1644Cys (h)	50
30	w	27	-	Deletion Exon 2 (h)		2
1	w	39	-	c.973G>A (h)	p.Gly325Arg (h)	17
14	w	5	-	c.3319G>A (h)	p.Gly1107Arg (h)	37
15	w	10	-	c.1073_1074insC (h)	p.Lys358AsnfsX53 (h)	19
32	w	29	-	c.2918-1G>C (IVS33-1G>C) (h)		IVS33
23	w	10	-	c.4793C>T (h)	p.Ser1598Phe (h)	49
20	w	6	-	c.2605G>A (h)	p.Gly869Arg (h)	31
2	w	17	therapiebedürftig	c.1165G>A (h)	p.Gly389Arg (h)	19
12	w	55	therapiebedürftig	c.3545G>T (h)	p.Gly1182Val (h)	39
31	w	46	therapiebedürftig	c.2396-1G>A (IVS29-1G>A) Mosaik 13-22%		IVS29

Tab. 17a: Hypertonie bei Mutationen in *COL4A5*; farbig die Patienten mit Hypertonie im Alter <50 Jahre und >50 Jahre
Alter in Jahren; w, weiblich (hell schraffiert); m, männlich (dunkel schraffiert); grün schraffiert Patienten mit Hypertonie
im Alter > 50 Jahre; rosa schraffiert Patienten mit Hypertonie im Alter < 50 Jahre; (h) heterozygot; ansonsten
hemizygot

Pat.	Geschl.	Alter	Hypertonie	Nukleotidveränderung	AS-Veränderung	Exon/Intron
7	m	18	therapiebedürftig	c.973G>A	p.Gly325Arg	17
4	m	17	therapiebedürftig	c.891+9T>G (IVS15+9T>G)		IVS15
11	m	34	therapiebedürftig	c.231+1G>A (IVS3+1G>A)		IVS3
8	m	16	therapiebedürftig	c.4787G>T	p.Gly1596Val	49
3	m	15	therapiebedürftig	c.4688+1G>A (IVS48+1G>A)		IVS48
2	w	17	therapiebedürftig	c.1165G>A (h)	p.Gly389Arg (h)	19
31	w	46	therapiebedürftig	c.2396-1G>A (IVS29-1G>A) Mosaik 13-22%		IVS29

Tab. 17b: Hypertonie bei Patienten im Alter < 50 Jahre mit Mutationen in *COL4A5*
(h) heterozygot; ansonsten hemizygot

3.6.2 Mutationen in COL4A4

Von den Patienten mit Mutationen in COL4A4 leidet keiner der Patienten an einer therapiebedürftigen Hypertonie (**Tab. 18**).

Pat.	Geschl.	Alter	Hypertonie	Nukleotidveränderung	AS-Veränderung	Exon
26	m	10	-	c.4208_4209insC (h)	p.Ser1403ProfsX29 (h)	44
22	w	5	-	c.4820delC (h)	p.Ala1607ValfsX49 (h)	48
27	w	33	-	c.1634G>C (h)	p.Gly545Ala (h)	23
17	w	15	-	c.2219dupC (H)	p.Val741CysfsX47 (H)	28

Tab. 18: Hypertonie bei Mutationen in COL4A4

Alter in Jahren; w, weiblich (hell schraffiert); m, männlich (dunkel schraffiert); (h) heterozygot; (H), homozygot

3.6.3 Mutationen in COL4A3

Von den Patienten mit Mutationen in COL4A3 leiden 66,7% an einer therapiebedürftigen Hypertonie, davon zwei weibliche und zwei männliche. Sämtliche dieser Patienten sind jünger als 40 Jahre. Die Mutationen kommen in der Mitte und am 3'-Ende des Gens vor (**Tab. 19**).

Pat.	Geschl.	Alter	Hypertonie	Nukleotidveränderung	AS-Veränderung	Exon
36	m	8	-	c.4887_4888delCA (H)	p.Tyr1629* (H)	51
34	m	26	therapiebedürftig	c.1219G>A (H)	p.Gly407Ser (H)	21
33	m	33	therapiebedürftig	c.4235G>A (h)	p.Gly1412Asp (h)	47
16	w	5	-	c.3575G>A (h)	p.Gly1192Glu (h)	42
21	w	10	therapiebedürftig	c.4280G>A (h)	p.Gly1427Asp (h)	48
				c.4559_4561delCAT (h)	p.Ser1520del (h)	49
9	w	34	therapiebedürftig	c.1892G>T (h)	p.Gly631Val (h)	26
				c.4981C>T (h)	p.Arg1661Cys (h)	52

Tab. 19: Hypertonie bei Mutationen in COL4A3

Alter in Jahren; w, weiblich (hell schraffiert); m, männlich (dunkel schraffiert); (h) heterozygot; (H), homozygot

3.7 Zusammenfassung der Ergebnisse

Bei 77,0% der molekulargenetisch untersuchten Patienten konnten Mutationen in COL4A3 (17,9%), COL4A4 (16,4%) oder COL4A5 (65,7%) nachgewiesen werden. Von 38 Patienten konnten vollständige Angaben zur klinischen Ausprägung der Erkrankung ermittelt werden. 15,8% der ins Patientenkollektiv eingeschlossenen Patienten weisen Mutationen in COL4A3, 10,5% in COL4A4 und 73,7% in COL4A5 auf. Die Befunde, die durch den Fragebogen erhoben wurden, sind in **Tab. 20**

zusammengefasst. Welche Symptome jeder einzelne Patient aufweist, ist in **Tab. 21** dargestellt. Hier wird auch aufgezeigt, welche Symptome isoliert auftreten. Zusätzlich sind Informationen bezüglich durchgeführter Nierentransplantation und Dialysepflichtigkeit angegeben. Zwei Patienten sind dialysepflichtig (Pat. 3 und 11). Zwei weitere Patienten wurden bereits nierentransplantiert (Pat. 6 und 7). War ein Patient zum Zeitpunkt der Studie bereits nierentransplantiert, wurden für Hämaturie und Proteinurie die Befunde ermittelt, die der Patient vor der Transplantation aufwies.

Die Ergebnisse machen deutlich ist, dass Männer häufiger und stärker von Hämaturie betroffen sind als Frauen. 78,6% der Patienten mit Mutationen in *COL4A5* weisen eine Hämaturie auf (82,4% der Männer und 72,4% der Frauen). Davon tritt in 22,7% der Fälle dieses Symptom isoliert auf und zwar dann, wenn sich die Mutation am 5'-Ende des Gens befindet. Obwohl Hämaturie als Leitsymptom des Alport-Syndroms gewertet wird, wird diese bei 21,4% der Patienten mit Mutationen in *COL4A5* nicht beobachtet. Sämtliche Patienten mit Mutationen in *COL4A4* haben eine Hämaturie, davon ein weiblicher und ein männlicher Patient isoliert (Pat. 26 und 22). Beide Patienten mit isolierter Hämaturie und Mutation in *COL4A4* haben Frameshift-Mutationen am 3'-Ende des Gens. Die Proteinurie tritt in unserem Patientenkollektiv bei insgesamt 71,1% der Patienten auf. Bei den Patienten mit *COL4A5*-Mutationen sind es 64,7% der Männer und 72,7% der Frauen, die eine Proteinurie aufweisen. In der Regel haben Patienten mit einer ausgeprägten Proteinurie auch eine ausgeprägte Hämaturie. Nichtsdestotrotz tritt die Proteinurie bei zwei Patienten mit Mutationen in *COL4A5* isoliert auf (Pat. 14., 15). Bei ihnen besteht also eine Proteinurie in Abwesenheit des sog. „Leitsymptoms“, der Hämaturie. Von den Patienten mit Mutationen in *COL4A4* wiesen zwei Frauen eine Proteinurie von ++ auf. Beide hatten Mutationen in der Mitte des Gens. Sämtliche Patienten mit Mutationen in *COL4A3* gaben eine Proteinurie von ++ an.

Hörstörungen, Augenveränderungen und Hypertonie traten im Patientenkollektiv niemals isoliert auf. Sie waren immer mit einer Hämaturie und/oder einer Proteinurie assoziiert. Insgesamt hatten 21,1% der Patienten im Patientenkollektiv eine Schwerhörigkeit (Pat. 20 ausgenommen, da die Schwerhörigkeit wahrscheinlich nicht Alportbedingt ist). Die einzige im Zusammenhang mit dem Alport-Syndrom beschriebene Augenveränderung, die im Patientenkollektiv diagnostiziert wurde, war ein Kerato-

konus bei einem 33-jährigen Patienten mit Mutation in *COL4A3*. Außerdem wies ein 64-jähriger Patient mit Deletion des Exons 2 des *COL4A5*-Gen eine Visusminderung auf. 39,5% der Patienten wurden antihypertensiv therapiert (15 Patienten). Das mittlere Alter dieser Patienten war 33,1 Jahre. 73,3% der Patienten, die antihypertensiv therapiert worden sind, waren unter 50 Jahre alt. Die Patienten, die unter 50 Jahre alt waren und Mutationen in *COL4A5* haben, haben ausschließlich Glycin- und Intron-Mutationen (Splice-site Mutationen und eine Mutation in IVS15+9, welche auch zu einem aberranten Spleißen führt). Keiner der Patienten mit Hypertonie hatte Mutationen in *COL4A4*. Bei den antihypertensiv behandelten Patienten mit Mutationen in *COL4A3* kamen die Mutationen in der Mitte und am 3'-Ende des Gens vor. Sie waren alle unter 50 Jahre alt.

	<i>COL4A5</i>		<i>COL4A4</i>		<i>COL4A3</i>	
	Männlich	Weiblich	Männlich	Weiblich	Männlich	Weiblich
keine Hämaturie	3	3	0	0	0	1
Hämaturie +	2	3	0	2	0	0
Hämaturie ++	5	4	0	1	2	2
Hämaturie +++	7	1	1	0	1	0
Keine Proteinurie	6	3	1	1	0	0
Proteinurie +	4	1	0	0	0	0
Proteinurie ++	4	7	0	2	3	3
Proteinurie +++	3	0	0	0	0	0
Hörstörungen	4	3	0	1	1	1
Augenveränderungen	1	1	0	1	1	0
Hypertonie	8	3	0	0	2	2

Tab. 20: Zusammenfassung der Ergebnisse

- Ergebnisse -

Pat.	Gen	Nukleotidveränderung	AS-Veränderung	Ex./In.		Geschl.	Alter	Häm.	Prot.	Hörstörung	Augenver.	Hypertonie	Dialyse	Transplantation
1	COL4A5	c.973G>A (h)	p.Gly325Arg (h)	17	MS	w	39	++	+	-	-	-	nein	nein
2	COL4A5	c.1165G>A (h)	p.Gly389Arg (h)	19	MS	w	17	+	+++	-	-	therapiebed.	nein	nein
3	COL4A5	c.4688+1G>A (IVS48+1G>A)		IVS48	SS	m	15	+++	+++	Schwerhörigkeit	-	therapiebed.	ja	nein
4	COL4A5	c.891+9T>G (IVS15+9T>G)		IVS15	IM	m	17	+	-	-	-	therapiebed.	nein	nein
5	COL4A5	c.4931C>G	p.Ser1644Cys	50	MS	m	51	++	+++	-	-	therapiebed.	nein	nein
6	COL4A5	c.4895G>A	p.Cys1632Tyr	50	MS	m	61	-	+	Schwerhörigkeit	-	therapiebed.	nein	ja
7	COL4A5	c.973G>A	p.Gly325Arg	17	MS	m	18	-	+	-	-	therapiebed.	nein	ja
8	COL4A5	c.4787G>T	p.Gly1596Val	49	MS	m	16	+++	++	Schwerhörigkeit	-	therapiebed.	nein	nein
9	COL4A3	c.1892G>T (h)	p.Gly631Val (h)	26	MS	w	34	++	++	Schwerhörigkeit	-	therapiebed.	nein	nein
		c.4981C>T (h)	p.Arg1661Cys (h)	52	MS									
10	COL4A5	c.965G>T	p.Gly322Val	17	MS	m	17	+	-	-	-	-	nein	nein
11	COL4A5	c.231+1G>A (IVS3+1G>A)		IVS3	SS	m	34	+++	+++	-	-	therapiebed.	ja	nein
12	COL4A5	c.3545G>T (h)	p.Gly1182Val (h)	39	MS	w	55	+	++	-	-	therapiebed.	nein	nein
13	COL4A5	c.4510+1G>T (IVS47+1G>T)		IVS47	SS	m	8	+++	++	-	-	-	nein	nein
14	COL4A5	c.3319G>A (h)	p.Gly1107Arg (h)	37	MS	w	5	-	++	-	-	-	nein	nein
15	COL4A5	c.1073_1074insC (h)	p.Lys358AsnfsX53 (h)	19	IS	w	10	-	++	-	-	-	nein	nein
16	COL4A3	c.3575G>A (h)	p.Gly1192Glu (h)	42	MS	w	5	++	++	-	-	-	nein	nein
17	COL4A4	c.2219dupC (H)	p.Val741CysfsX47 (H)	28	Dup	w	15	+	++	Schwerhörigkeit	Ptois li.	-	nein	nein
18	COL4A5	c.936+1G>A (IVS16+1G>A)		IVS16	SS	m	12	++	+	-	-	-	nein	nein
19	COL4A5	c.560_561dupCC	p.Thr188ProfsX16	10	Dup	m	5	+++	+	-	-	-	nein	nein
20	COL4A5	c.2605G>A (h)	p.Gly869Arg (h)	31	MS	w	6	++	++	Schwerhörigkeit postpartal	-	-	nein	nein
21	COL4A3	c.4280G>A (h)	p.Gly1427Asp (h)	48	MS	w	10	-	++	-	-	therapiebed.	nein	nein
		c.4559_4561delCAT (h)	p.Ser1520del (h)	49	Del									
22	COL4A4	c.4820delC (h)	p.Ala1607ValfsX49 (h)	48	Del	w	5	++	-	-	-	-	nein	nein
23	COL4A5	c.4793C>T (h)	p.Ser1598Phe (h)	49	MS	w	10	++	++	-	-	-	nein	nein
24	COL4A5	c.4931C>G (h)	p.Ser1644Cys (h)	50	MS	w	31	-	-	-	-	-	nein	nein
25	COL4A5	c.1871G>A	p.Gly624Asp	25	MS	m	6	++	-	-	-	-	nein	nein
26	COL4A4	c.4208_4209insC (h)	p.Ser1403ProfsX29 (h)	44	IS	m	10	+++	-	-	-	-	nein	nein
27	COL4A4	c.1634G>C (h)	p.Gly545Ala (h)	23	MS	w	33	+	++	-	-	-	nein	nein
28	COL4A5	Deletion Exon 2		2	Del	m	64	++	++	Schwerhörigkeit	Visusmind.	therapiebed.	nein	nein
29	COL4A5	Deletion Exon 2		2	Del	m	2	-	-	-	-	-	nein	nein
30	COL4A5	Deletion Exon 2 (h)		2	Del	w	27	+++	-	-	-	-	nein	nein
31	COL4A5	c.2396-1G>A (IVS29-1G>A); Mosaik 13-22%		IVS29	SS	w	46	++	-	Schwerhörigkeit	Myopie	therapiebed.	nein	nein
32	COL4A5	c.2918-1G>C (IVS33-1G>C) (h)		IVS33	SS	w	29	+	++	-	-	-	nein	nein
33	COL4A3	c.4235G>A (h)	p.Gly1412Asp (h)	47	MS	m	33	++	++	-	Keratokonius	therapiebed.	nein	nein
34	COL4A3	c.1219G>A (H)	p.Gly407Ser (H)	21	MS	m	26	++	++	-	-	therapiebed.	nein	nein
35	COL4A5	c.4793C>T	p.Ser1598Phe	49	MS	m	14	+++	++	-	-	-	nein	nein
36	COL4A3	c.4887_4888delCA (H)	p.Tyr1629* (H)	51	NS	m	8	+++	++	Schwerhörigkeit	-	-	nein	nein
37	COL4A5	c.384G>A	p.Lys128Lys	6	Still	m	7	++	-	-	-	-	nein	nein
38	COL4A5	c.1871G>A	p.Gly624Asp	25	MS	m	11	+++	-	-	-	-	nein	nein

Tab. 21: Symptome und Mutationen der Patienten

Alter in Jahren; Ex., Exon; In., Intron; Geschl., Geschlecht; w, weiblich; m, männlich; Häm., Hämaturie; Prot., Proteinurie; therapiebed., therapiebedürftig; Augenver., Augenveränderungen; (h), heterozygot; (H), homozygot; ansonsten hemizygot; MS, Missense-Mutation; NS, Nonsense-Mutation; SS, Splice-site-Mutation; IM, Intron-Mutation; IS, Insertion; Del, Deletion; Dup, Duplikation; Still, stille Mutation; gelb markiert sind insoliert aufgetretene Symptome; Schwerhörigkeit von Patientin 20 wahrscheinlich nicht Alport-bedingt (braun)

4 Diskussion

Martin et al. ermittelten 1998 für *COL4A5* eine Detektionsrate von 82%, Gross et al. 2002 eine von 74% (Martin et al. 1998, Gross et al. 2002). Nagel et al. erhielten für Patienten mit eindeutigen Diagnosekriterien und einer typischen Familienanamnese für XLAS oder die autosomal-rezessive Form des Alport-Syndroms eine Detektionsrate für Mutationen von 90% (Nagel et al. 2005). In der vorliegenden Arbeit, bei der die Diagnosekriterien für den Verdacht eines Alport-Syndroms vom behandelnden Arzt abhängig waren, ergibt sich eine ähnliche Detektionsrate von 77,0%. Möglicherweise liegt bei einigen Patienten, bei denen keine ursächliche Mutation gefunden werden konnte, eine andere Grunderkrankung vor. Differentialdiagnostisch kommen, wie bereits in der Einleitung erwähnt, u.a. die Nephropathie vom Typ der Dünnen Basalmembran oder auch andere renale und extrarenale Ursachen in Frage. Eine sichere Diagnose wird meist über ein nephrologisches Zentrum gestellt. Die genaue Prävalenz der Erkrankung in der Bevölkerung ist bisher nicht bekannt. Sie wird allerdings niedriger geschätzt, als sie von Atkins et al. für die Bevölkerung von Utah beschrieben worden ist (1:5000) (Atkins et al. 1988, Gubler 2008). Der Großteil der Patienten wird von Kinderneurologen und Erwachsenen-Nephrologen betreut, jedoch wird auch ein kleiner Teil der Patienten über den Allgemeinarzt versorgt. Zum Ausschluss bzw. Nachweis der Diagnose wird den Patienten heute meist eine molekulargenetische Untersuchung empfohlen, um die invasive Diagnostik einer Nieren- oder/und Hautbiopsie zu vermeiden. In unserem Patientenkollektiv wurde eine geringe Anzahl an Patienten vom Allgemeinmediziner zur molekulargenetischen Untersuchung überwiesen, was auch aufgrund der eingeschränkten klinischen Diagnostik bei möglichem Vorliegen einer anderen nephrologischen Erkrankung einen Einfluss auf die Detektionsrate haben könnte. Unumstritten bleibt, dass die molekulargenetische Untersuchung als einzige Untersuchungsmethode eine eindeutige Diagnose des Alport-Syndroms erlaubt (Anton-Martin et al. 2012).

Im Patientenkollektiv (n=38) verteilen sich die Mutationen, die nachgewiesen wurden, zu 73,7% auf *COL4A5*, zu 10,5% auf *COL4A4* und zu 15,8% auf *COL4A3*. Dies entspricht in etwa der Verteilung, die in der Literatur mehrfach beschrieben wurde: Laut Kashtan befinden sich nämlich beim Alport-Syndrom 80% der Mutationen im *COL4A5*-Gen, der Rest verteilt sich auf *COL4A3* und *COL4A4* (Kashtan 2000). Obwohl in der

Literatur bereits über 600 Mutationen beschrieben worden sind, handelt es sich in unserem Patientenkollektiv bei 32 von 40 nachgewiesenen Mutationen um unbekannte, noch nicht beschriebene Mutationen. Dies entspricht einem Anteil von 80% (HGMD, ARUP). Nur acht der in unserem Kollektiv nachgewiesenen Mutationen wurden in der Literatur bereits beschrieben (Knebelmann et al. 1992, Martin et al. 1998 usw., siehe Tab. 1, Seite 36). Es gibt unvorstellbar viele Variationsmöglichkeiten an Mutationen. Zudem ist die Lokalisation der Mutationen nicht nur auf wenige Regionen der Gene beschränkt, sondern verteilt sich vielmehr über das gesamte Gen hinweg, was sich auch in unserem Patientenkollektiv zeigt. Dies erschwert die Entwicklung prädiktiver genetischer Tests (Hudson et al. 2003). Wie bereits Bekheirnia et al. beschrieben haben, reichen die Arten der Mutationen von Punktmutationen bis zu Deletionen ganzer Regionen (Bekheirnia et al. 2010). In unserem Kollektiv sind die Mehrzahl nachgewiesener Mutationen Missense-Mutationen (55%, 22/40). Zum größten Teil handelt es sich hierbei um Glycin-Mutationen (72,7%, 16/22). Glycin-Mutationen kommen häufig vor, da in den Ketten des Kollagen-Proteins jede dritte Aminosäure ein Glycin darstellt (Kashtan 2000). Dies ist notwendig für die Ausbildung einer Trippelhelix im Protein (Hudson et al. 2003). Wird Glycin durch eine andere Aminosäure ausgetauscht, kommt es zu einer Fehlbildung der Trippelhelix. Dies führt zu ultrastrukturellen Veränderungen und somit auch zu einem Funktionsverlust der GBM (Hudson et al. 2003). Zu beachten gilt, dass in unserem Patientenkollektiv der Glycin-Austausch weit häufiger als bei einem Drittel der Patienten vorliegt. Im unserem Kollektiv konnten zwei Mutationen bei jeweils zwei Patienten nachgewiesen werden, obwohl diese Patienten nicht miteinander verwandt sind: Bei Patientin 1 und Patient 7 handelt es sich um die Mutation p.Gly325Arg im Exon 17, bei Patient 25 und Patient 38 um die Mutation p.Gly624Asp. Beide Mutationen sind Glycin-Mutationen, die in der Literatur bereits beschrieben wurden (Knebelmann et al. 1992, Martin et al. 1998). Diese Mutationen scheinen demnach häufiger vorzukommen. Inwieweit gewisse Mutationen, insbesondere Glycin-Mutationen, gehäuft auftreten, gilt es allerdings noch genauer zu untersuchen. Neben Missense-Mutationen kommen in unserem Patientenkollektiv Nonsense-, Frameshift-, Splice site- bzw. Intron, stille Mutationen und Deletionen (auch zum Teil ganzer Exons) vor.

Im Hinblick auf die Symptomatik der Patienten fällt auf, dass 18,4% keine Hämaturie aufweisen, obwohl Hämaturie als eines der Leitsymptome des Alport-Syndroms gilt. Das mittlere Alter der Patienten ohne Hämaturie beträgt 19,6 Jahre. Es handelt sich um

fünf pädiatrische und drei adulte Patienten. Zu beachten ist auch, dass beim Alport-Syndrom eine Proteinurie isoliert auftreten kann und nicht immer mit einer Hämaturie assoziiert sein muss. Im vorliegenden Patientenkollektiv haben fünf Patienten (13,2%) eine Proteinurie ohne Hämaturie. Zwei davon weisen keine weiteren Symptome auf. Mit einer Präsenz von 71,1% stellt sich die Proteinurie genauso als Leitsymptom wie die Hämaturie dar. Nichtsdestotrotz kann auch die Hämaturie isoliert und unabhängig von anderen Symptomen auftreten (siehe unten).

Betrachtet man die Hämaturie und Proteinurie separat nur bei den Patienten mit *COL4A5*-Mutationen, lassen sich unsere Ergebnisse gut mit den Ergebnissen der Studien von Jais et al. vergleichen, bei denen nur Patienten mit *COL4A5*-Mutationen eingeschlossen worden sind (Jais et al. 2000, Jais et al. 2003): in unserem Kollektiv haben 72,7% der Frauen mit *COL4A5*-Mutationen und 95% der Männer eine Hämaturie. Jais et al. geben einen Anteil von 95% bei Frauen und 100% bei Männern an. Bezüglich Proteinurie weisen in unserem Kollektiv 72,7% der Frauen mit *COL4A5*-Mutationen und 64,7% der Männer diese auf. Bei Jais et al. waren es 75% der Frauen und 95% der Männer. Die durchweg geringeren Prozentzahlen bei Hämaturie und Proteinurie bei Männern und Frauen in unserer Studie sind dadurch zu erklären, dass es sich bei unserem Patientenkollektiv mit einem Durchschnittsalter von 20,55 Jahren um ein sehr junges Kollektiv handelt. 24 der Patienten war zum Zeitpunkt der Befragung unter 18 Jahre alt. Es handelt sich um eine sogenannten *selection bias*, der in der Studie nicht vermieden werden konnte. Womöglich tritt bei diesen pädiatrischen Patienten im Verlauf der Erkrankung eine Hämaturie/eine Proteinurie noch auf, auch wenn diese bisher noch nicht nachgewiesen werden konnte. Eine regelmäßige Untersuchung sollte bei diesen Patienten fortlaufend durchgeführt werden, um eine Hämaturie oder Proteinurie frühzeitig zu erkennen. Neben einem *selection bias* kann es bei retrospektiven Studien zu einem sogenannten *recall bias* kommen. Dies wäre der Fall, wenn sich der Befragte/die Befragte nicht mehr daran erinnert, dass bei ihr/ihm einmal eine Hämaturie/eine Proteinurie aufgetreten ist (Grimes und Schulz 2002). Dies ist jedoch bei unserer Studie nicht zu erwarten, da die klinischen Angaben in Zusammenarbeit mit dem betreuenden Arzt erhoben und entsprechend den klinischen Daten in den Patientenakten übermittelt wurden. Genau wie Jais et al. konnten auch wir bezüglich Hämaturie und Proteinurie keine Genotyp-Phänotyp-Korrelation nachweisen (Jais et al. 2000, Jais et al. 2003).

In unserer Studie wurde zusätzlich Augenmerk auf isoliert auftretende Symptome gerichtet. Patienten mit isolierter Hämaturie und Mutationen in *COL4A5* haben diese ausschließlich am 5'-Ende des Gens. In drei von fünf Fällen handelt es sich hierbei um Missense-Mutationen mit einem Austausch von Glycin. Missense-Mutationen werden sowohl in den Studien von Jais et al., als auch in der Arbeit von Bekheirnia et al. mit einem eher milderen Verlauf des Alport-Syndroms in Verbindung gebracht. Die Rate an Entwicklung einer ESRD sowie einer Schwerhörigkeit und Augenveränderungen sei bei Missense-Mutationen am niedrigsten (Bekheirnia et al. 2012, Jais et al. 2003, Jais et al. 2000). Inwieweit Missense-Mutationen mit isoliert auftretenden Symptomen in Verbindung stehen, wurde bislang nicht untersucht. In unserem Kollektiv haben die Patienten mit isolierter Hämaturie und Mutationen in *COL4A4* diese am 3'-Ende des Gens. Hier handelt es sich um Frameshift-Mutationen. Genotyp-Phänotyp-Korrelationen bei Patienten mit *COL4A4*- und *COL4A3*-Mutationen wurden bisher noch nicht untersucht. Da das Alport-Syndrom eine seltene Erkrankung ist und insbesondere Mutationen in *COL4A4* und *COL4A3* nur selten auftreten (in unserem Kollektiv nur bei 10,5% und 15,8% der Patienten), sind Aussagen über Genotyp-Phänotyp-Korrelationen derzeit nicht möglich. Um eine mögliche Genotyp-Phänotyp-Korrelation nachweisen zu können, ist eine Steigerung der Patientenzahl notwendig.

In unserem Patientenkollektiv haben insgesamt 21,1% der Patienten eine Schwerhörigkeit (Pat. 20 ausgeschlossen, da Schwerhörigkeit wahrscheinlich nicht durch das Alport-Syndrom bedingt ist). Laut Gross, Koepke und Weber geht das Alport-Syndrom in 60-80% der Fälle mit einer bilateralen sensorineuralen Hörminderung einher (Gross, Koepke und Weber 2004). In einer Studie von Gross et al. aus dem Jahr 2002 war die Schwerhörigkeit bei 73% der Patienten mit Mutationen in *COL4A5* präsent. Hierbei wurden allerdings nur männliche Patienten untersucht. In einem gemischten Kollektiv würde man den Anteil niedriger schätzen. In den Studien von Jais et al. hatten 28% der Frauen und 79% der Männer mit *COL4A5*-Mutationen einen Hörverlust. Der geringe Anteil an Patienten mit Schwerhörigkeit in unserem Kollektiv hat mehrere Ursachen. 63,2% unserer Patienten sind pädiatrische Patienten. Diese Patienten werden womöglich erst noch im Verlauf eine Schwerhörigkeit entwickeln. Laut Kashtan lässt sich beim XLAS zwar die Hörminderung bei männlichen Patienten schon in der Kindheit und im jungen Erwachsenenalter nachweisen (Kashtan et al. 2001), dennoch ist davon auszugehen, dass sich insbesondere bei milderen Verläufen ein Hörverlust erst im

Erwachsenenalter bemerkbar macht. Als weitere Ursache kommt also in Betracht, dass die Patienten nicht regelmäßig audiometrisch untersucht werden und dem Patienten eine Hörminderung erst dann auffällt, wenn diese ihn im Alltag einschränkt. Bei Alport-Patienten sollte daher in regelmäßigen Abständen eine Audiometrie-Untersuchung und bei Schwerhörigkeit eine Hörgeräteversorgung erfolgen. Laut Jais et al. liegt das Risiko bis zum 40. Lebensjahr eine Schwerhörigkeit zu erleiden, für Männer mit *COL4A5*-Mutationen bei 90% und für Frauen bei 10% (Jais et al. 2000). Durch eine Versorgung mit einem Hörgerät kann vielen Alport-Patienten ein Stück Lebensqualität geboten werden.

Eine regelmäßige Untersuchung der Augen sollte ebenfalls erfolgen. In der Literatur wird beschrieben, dass das Alport-Syndrom in 25-40% der Fälle mit okulären Veränderungen assoziiert ist (Gross, Koepke und Weber 2004). In unserem Patientenkollektiv ist bei lediglich vier Patienten eine Augenveränderung bekannt, noch dazu handelt es sich hierbei zum Teil um eine unzureichende Diagnosestellung. Auch hier wird nochmals darauf hingewiesen, dass nach augenärztlicher Untersuchung durch ophthalmologische Intervention eine Symptomlinderung erreicht werden kann (Gupta et al. 2011).

In unserem Patientenkollektiv haben 39,5% Patienten eine therapiebedürftige Hypertonie (15/38), und zwar 29,4% der Frauen (5/17) und 47,6% der Männer (10/21). Bezüglich der Hypertonie bei Alport-Syndrom gibt es bislang keine Studien zur Genotyp-Phänotyp-Korrelation. In vorliegender Arbeit wurde besonderes Augenmerk auf die Patienten, die unter 50 Jahre alt sind und dennoch eine Hypertonie aufweisen, gelegt. Bei den Patienten mit *COL4A5*-Mutationen handelt es sich hierbei lediglich um Glycin- und Intron-Mutationen (Splice-site Mutationen und eine Mutation im Intron 15 IVS15+9, bei der davon auszugehen ist, dass diese zu einem aberranten Spleißen führt). Die Patienten mit Mutationen in *COL4A3*, die eine therapiebedürftige Hypertonie haben, sind alle unter 50 Jahre alt und haben ausschließlich Mutationen in der Mitte und am 3'-Ende des Gens. Für die Zukunft wäre sicherlich aufschlussreich, eine genauere Untersuchung der Genotyp-Phänotyp-Korrelation zur Hypertonie bei Alport-Syndrom an einem größeren Kollektiv, insbesondere bei Alport-Patienten mit *COL4A5*- und *COL4A3*-Mutationen, durchzuführen.

5 Zusammenfassung

Das Alport-Syndrom ist eine genetisch bedingte progressive Nierenerkrankung, die durch Hämaturie und Proteinurie, Schwerhörigkeit und Augenveränderungen gekennzeichnet ist. Mutationen in den Genen *COL4A3*, *COL4A4* und *COL4A5* werden für die Erkrankung verantwortlich gemacht. Diese führen zu Strukturveränderungen im Typ-IV-Kollagen und damit zu einem Funktionsverlust der glomerulären Basalmembran in den Nieren. In etwa 15% der Fälle wird die Erkrankung autosomal-rezessiv und in etwa 5% der Fälle autosomal-dominant vererbt. Hierbei sind die Gene *COL4A3* und *COL4A4* betroffen. In der Mehrzahl der Fälle (bei etwa 80%) ist allerdings das Gen *COL4A5* betroffen, welches sich auf dem X-Chromosom befindet (Kashtan 2000). Man spricht hierbei vom sogenannten „X-linked Alport-Syndrom“ (XLAS). Nichtsdestotrotz können auch Frauen erhebliche Symptome des Alport-Syndroms aufweisen, da es durch eine ungünstige X-Inaktivierung des unveränderten X-Chromosoms zu Funktionseinbußen kommen kann. Ziel dieser Arbeit war es, die Krankheitsausprägung bei Männern und Frauen miteinander zu vergleichen und zudem zu untersuchen, ob es Hinweise auf eine Genotyp-Phänotyp-Korrelation gibt, da es in der Literatur diesbezüglich für Frauen und Männern widersprüchliche Angaben gibt (Gross et al. 2002, Jais et al. 2000 und Jais et al. 2003). Für die vorliegende Studie wurden 87 Patienten mit Verdacht auf Alport-Syndrom molekulargenetisch untersucht, von denen bei 67 Patienten Mutationen in den Genen *COL4A5*, *COL4A4* und *COL4A3* nachgewiesen werden konnten. Dies entspricht einer Detektionsrate von 77,0%. Die Patienten erhielten einen Fragebogen, der Fragen zur Familienanamnese, zur Symptomatik und zu laborchemischen Befunden des Patienten enthielt. Es wurde insbesondere Augenmerk auf Hämaturie und Proteinurie gelegt. Zudem wurde im Fragebogen nach Nierenbiopsien, Medikamenteneinnahmen, Dialysepflichtigkeit und Nierentransplantationen gefragt. War ein Patient zum Zeitpunkt der Befragung bereits nierentransplantiert, wurden bezüglich Hämaturie und Proteinurie die Befunde ermittelt, die der Patient aufwies, bevor er die Transplantatniere erhielt. Von insgesamt 38 Patienten konnten vollständige Angaben ermittelt werden. Bei 15,8% (6 Patienten) der Patienten wurden Mutationen in *COL4A3*, bei 10,5% (4 Patienten) Mutationen in *COL4A4* und bei 73,7% (28 Patienten) Mutationen in *COL4A5* nachgewiesen. In unserem Patientenkollektiv haben insgesamt 81,6% der Patienten eine Hämaturie. Bei den Patienten mit *COL4A5*-Mutationen sind es anteilig 78,5% der Patienten mit Hämaturie. Wie erwartet, sind Männer zwar häufiger und stärker von Hämaturie betroffen als Frauen, aber auch ein erheblicher Anteil der Frauen zeigt eine

Hämaturie (82,4% der Männer und 72,4% der Frauen mit *COL4A5*-Mutationen). Bei 22,7% der Patienten mit *COL4A5*-Mutationen tritt das Symptom der Hämaturie isoliert auf, und zwar dann, wenn sich die Mutation am 5'-Ende des Gens befindet. Obwohl die Hämaturie als eines der Leitsymptome des Alport-Syndroms gilt, fällt auf, dass insgesamt 18,4% der Patienten keine Hämaturie haben. Bei den Patienten mit *COL4A5*-Mutationen sind es anteilig 21,4% der Patienten, bei denen bisher keine Hämaturie nachgewiesen wurde. Von den Patienten mit *COL4A4*-Mutationen haben in unserem Kollektiv sämtliche Patienten eine Hämaturie, zwei davon als isoliertes Symptom (beide mit Frameshift-Mutationen am 3'-Ende des Gens). Eine Proteinurie haben in unserem Patientenkollektiv insgesamt 71,1% der Patienten. Bei den Patienten mit Mutationen in *COL4A5* sind es 64,7% der Männer und 72,7% der Frauen. Bei zwei Patienten mit Mutationen in *COL4A5* tritt die Proteinurie isoliert, also in Abwesenheit des „Leitsymptoms“ Hämaturie auf. Von den Patienten mit Mutationen in *COL4A4* wiesen die Patientinnen mit Proteinurie Mutationen in der Mitte des Gens auf. Sämtliche Patienten mit Mutationen in *COL4A3* haben eine Proteinurie von ++. In unserem Patientenkollektiv haben die Patienten mit Hörstörung, Augenveränderungen und/oder Hypertonie, auch immer eine Hämaturie und/oder einer Proteinurie. Im Kollektiv haben 21,1% der Patienten eine Schwerhörigkeit (Pat. 20 ausgenommen, da die Schwerhörigkeit wahrscheinlich nicht Alport-bedingt ist). Die einzige mit dem Alport-Syndrom assoziierte Augenveränderung, die im Patientenkollektiv diagnostiziert wurde, ist ein Keratokonus bei einem 33-jährigen Patienten mit Mutation in *COL4A3*. Schwerhörigkeit und Augenveränderungen waren nur selten bekannt und diagnostiziert, da wahrscheinlich keine regelmäßigen ophthalmologischen und audiometrischen Untersuchungen durchgeführt werden. Eine therapiebedürftige Hypertonie besteht bei 39,5% der Patienten, die ein Durchschnittsalter von 33,1 Jahren aufweisen. 73,3% der Patienten, die antihypertensiv therapiert worden sind, waren unter 50 Jahre alt. Die Patienten, die unter 50 Jahre alt waren und Mutationen in *COL4A5* haben, haben ausschließlich Glycin- und Intron-Mutationen (Splice-site Mutationen und eine Mutation in IVS15+9, welche auch zu einem aberranten Spleißen führt). Keiner der Patienten mit Hypertonie hat Mutationen in *COL4A4*. Bei den antihypertensiv behandelten Patienten mit Mutationen in *COL4A3* kommen die Mutationen in der Mitte und am 3'-Ende des Gens vor. Sie waren alle unter 50 Jahre alt. Für die Zukunft wäre sicherlich aufschlussreich, eine genauere Untersuchung der Genotyp-Phänotyp-Korrelation zur

Hypertonie bei Alport-Syndrom an einem größeren Kollektiv, insbesondere bei Alport-Patienten mit *COL4A5*- und *COL4A3*-Mutationen, durchzuführen.

6 Literaturverzeichnis

- **Abreu-Velez AM, Howard MS:** Collagen IV in normal skin and in pathological processes. *North American Journal of Medical Sciences* 4 (1) (Januar): 1–8, 2012
- **Alport AC:** Hereditary familial congenital haemorrhagic nephritis. *British medical journal* 1 (3454) (März 19): 504–506, 1927
- **Anker MC, Arnemann J, Neumann K, Ahrens P, Schmidt H, König R:** Alport Syndrome with Diffuse Leiomyomatosis. *American Journal of Medical Genetics Part A* 119A (3) (Januar 23): 381–385, 2003
- **Anton-Martin P, Lopez CA, Ramiro-Leon S, Garzon SS, Santos-Simarro F, Gil-Fournier B:** Alport Syndrome: De Novo Mutation in the COL4A5 Gene Converting Glycine 1205 to Valine. *Clinical Medicine Insights: Pediatrics* 6: 41–49, 2012
- **Atkin CL et al.:** Alport syndrome. *Diseases of the Kidney* 4: 617–641, 1988
- **Bekheirnia MR, Reed B, Gregory MC, McFann K, Shamsirsaz AA, Masoumi A, Schrier RW:** Genotype-Phenotype Correlation in X-Linked Alport Syndrome. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN* 21 (5) (Mai): 876–883, 2010
- **Boutaud A, Borza DB, Bondar O, Gunwar S, Netzer KO, Singh N, Ninomiya Y, Sado Y, Noelken ME, Hudson BG:** Type IV collagen of the glomerular basement membrane. Evidence that the chain specificity of network assembly is encoded by the noncollagenous NC1 domains. *The Journal of biological chemistry* 275 (39) (September 29): 30716–30724, 2000
- **Byrne MC, Budisavljevic MN, Fan Z, Self SE, Ploth DW:** Renal transplant in patients with Alport's syndrome. *American journal of kidney diseases: the official journal of the National Kidney Foundation* 39 (4) (April): 769–775, 2002
- **Colville DJ, Savige J:** Alport syndrome. A review of the ocular manifestations. *Ophthalmic genetics* 18 (4) (Dezember): 161–173, 1997
- **Cosgrove D, Meehan DT, Grunkemeyer JA, Kornak JM, Sayers R, Hunter WJ, Samuelson GC:** Collagen COL4A3 knockout: a mouse model for autosomal Alport syndrome. *Genes & development* 10 (23) (Dezember 1): 2981–2992, 1996
- **Flinter F:** Genetics of classic Alport's Syndrome. *The Lancet* 332 (8618) (Oktober): 1005–1007, 1988
- **Flinter F:** Alport's syndrome. *Journal of Medical Genetics* 34 (4) (April): 326–330, 1997
- **Grimes DA, Schulz KF:** Bias and causal associations in observational research. *The Lancet* 359: 248–52, 2002

- **Gross O, Netzer K-O, Lambrecht R, Seibold S, Weber M:** Meta-analysis of genotype-phenotype correlation in X-linked Alport syndrome: impact on clinical counselling. *Nephrology Dialysis Transplantation* 17: 1218-1227, 2002
- **Gross O, Beirowski B, Koepke ML, Kuck J, Reiner M, Addicks K, Smyth N, Schulze-Lohoff E, Weber M:** Preemptive ramipril therapy delays renal failure and reduces renal fibrosis in COL4A3-knockout mice with Alport syndrome. *Kidney international* 63 (2) (Februar): 438–446, 2003
- **Gross O, Koepke ML, Weber M:** Alport-Syndrom und familiäre benigne Hämaturie Eine Übersicht über hereditäre Erkrankungen des Typ-IV-Kollagens der Gefäßbasalmembranen. *Nieren- und Hochdruckkrankheiten* 33 (7): 348–356, 2004
- **Gross O, Schulze-Lohoff E, Koepke ML, Beirowski B, Addicks K, Bloch W, Smyth N, Weber M:** Antifibrotic, nephroprotective potential of ACE inhibitor vs AT1 antagonist in a murine model of renal fibrosis. *Nephrology, dialysis, transplantation: official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* 19 (7) (Juli): 1716–1723, 2004
- **Grünfeld JP:** Contemporary diagnostic approach in Alport's syndrome. *Renal failure* 22 (6) (November): 759–763, 2000
- **Gubler MC, Knebelmann B, Beziau A, Broyer M, Pirson Y, Haddoum F, Kleppel MM, Antignac C:** Autosomal recessive Alport syndrome: immunohistochemical study of type IV collagen chain distribution. *Kidney international* 47 (4) (April): 1142–1147, 1995
- **Gubler MC:** Inherited diseases of the glomerular basement membrane. *Nature Clinical Practice Nephrology* 4: 24-37, 2008
- **Gupta A, Ramesh Babu K, Srinivasan R, Mohanty D:** Clear lens extraction in Alport syndrome with combined anterior and posterior lenticonus or ruptured anterior lens capsule. *Journal of cataract and refractive surgery* 37 (11) (November): 2075–2078, 2011
- **Guthrie L:** 'Idiopathic' or congenital, hereditary and family haematuria. *The Lancet* 159 (4105) (Mai 3): 1243–1246, 1927
- **Haas M:** Alport Syndrome and Thin Glomerular Basement Membrane Nephropathy: A Practical Approach to Diagnosis. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine Online* 133: 224–232, 2009
- **Heath KE, Campos-Barros A, Toren A, Rozenfeld-Granot G, Carlsson LE, Savage J, Denison JC et al.:** Nonmuscle Myosin Heavy Chain IIA Mutations Define a Spectrum of Autosomal Dominant Macrothrombocytopenias: May-Hegglin Anomaly and Fechtner, Sebastian, Epstein, and Alport-Like Syndromes. *American Journal of Human Genetics* 69 (5) (November): 1033–1045, 2001

- **Heikkila P, Parpala T, Lukkarinen O, Weber M, Tryggvason K:** Adenovirus-mediated gene transfer into kidney glomeruli using an ex vivo and in vivo kidney perfusion system - first steps towards gene therapy of Alport syndrome. *Gene therapy* 3 (1) (Januar): 21–27, 1996
- **Hinglais N, Grünfeld JP, Bois E:** Characteristic ultrastructural lesion of the glomerular basement membrane in progressive hereditary nephritis (Alport's syndrome). *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 27 (5) (November): 473–487, 1972
- **Hopfer H, Mihatsch MJ:** Hereditäre Nephropathien. *Der Nephrologe* 5 (6) (September 18): 508–516, 2010
- **Hudson BG, Tryggvason K, Sundaramoorthy M, Neilson EG:** Alport's syndrome, Goodpasture's syndrome, and type IV collagen. *The New England journal of medicine* 348 (25) (Juni 19): 2543–2556, 2003
- **Hurst AF:** Hereditary familial congenital haemorrhagic nephritis occurring in sixteen individuals in three generations. *Guy's Hospital Reports* 3: 368–370, 1923
- **Hurst AF:** Hereditary familial congenital haemorrhagic nephritis. *British Medical Journal* 1 (3456) (April 2): 643, 1927.
- **Jais JP, Knebelmann B, Giatras I, De Marchi M, Rizzoni G, Renieri A, Weber M et al.:** X-Linked Alport Syndrome: Natural History in 195 Families and Genotype-phenotype Correlations in Males. *Journal of the American Society of Nephrology* 11 (4): 649–657, 2000
- **Jais JP, Knebelmann B, Giatras I, De Marchi M, Rizzoni G, Renieri A, Weber M et al.:** X-Linked Alport Syndrome: Natural History and Genotype-phenotype Correlations in Girls and Women Belonging to 195 Families: A “European Community Alport Syndrome Concerted Action” Study. *Journal of the American Society of Nephrology* 14 (10): 2603–2610, 2003
- **Jansen JJ, Maassen JA, van der Woude FJ, Lemmink HA, van den Ouweland JM, t'Hart LM, Smeets HJ, Bruijn JA, Lemkes HH:** Mutation in Mitochondrial tRNA(Leu(UUR)) Gene Associated with Progressive Kidney Disease. *Journal of the American Society of Nephrology* 8 (7) (Januar 7): 1118–1124, 1997
- **Kalluri R, Cantley LG, Kerjaschki D, Neilson EG:** Reactive Oxygen Species Expose Cryptic Epitopes Associated with Autoimmune Goodpasture Syndrome. *Journal of Biological Chemistry* 275 (26) (Juni 30): 20027–20032, 2000
- **Kalluri R, Shield CF, Todd P, Hudson BG, Neilson EG:** Isoform switching of type IV collagen is developmentally arrested in X-linked Alport syndrome leading to increased susceptibility of renal basement membranes to endoproteolysis. *Journal of Clinical Investigation* 99 (10) (Mai 15): 2470–2478, 1997

- **Kashtan CE:** Alport Syndrome: Abnormalities of Type IV collagen genes and proteins. *Renal failure* 22 (6): 737–749, 2000
- **Kashtan CE:** Alport syndrome: Renal transplantation and donor selection. *Renal failure* 22 (6): 765–768, 2000
- **Kashtan CE:** Familial hematuria. *Pediatric Nephrology (Berlin, Germany)* 24 (10) (Oktober): 1951–1958, 2009
- **Kashtan CE, Pagon RA, Bird TD, Dolan CR, et al.:** Collagen IV-Related Nephropathies (Alport Syndrome and Thin Basement Membrane Nephropathy). *GeneReviews™* [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-. verfügbar über: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1207/>, 2001 August 28 [Updated 2013 Feb 28], 2001
- **Kashtan CE, Kleppel MM, Gubler MC:** Immunohistologic findings in Alport syndrome. *Contributions to nephrology* 117: 142–153, 1996
- **Kashtan CE, Segal Y, Flinter F, Makanjuola D, Gan JS, Watnick T:** Aortic abnormalities in males with Alport syndrome. *Nephrology Dialysis Transplantation* 25 (11) (November): 3554–3560, 2010
- **Klinke R, Pape HC, Silbernagl S:** Physiologie, Seite 336 in 5. Aufl. Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 2005
- **Knebelmann B, Deschenes G, Gros F, Hors M-C, Grünfeld J-P, Tryggvason K, Gubler M-C, Antignac C:** Substitution of Arginine for Glycine 325 in the Collagen $\alpha 5$ (IV) Chain Associated with X-linked Alport Syndrome: Characterization of the Mutation by Direct Sequencing of PCR-amplified Lymphoblast cDNA Fragments. *The American Journal of Human Genetics* 51:135-142, 1992
- **Koepke ML, Weber M, Schulze-Lohoff E, Beirowski B, Segerer S, Gross O:** Nephroprotective effect of the HMG-CoA-reductase inhibitor cerivastatin in a mouse model of progressive renal fibrosis in Alport syndrome. *Nephrology, dialysis, transplantation: official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* 22 (4) (April): 1062–1069, 2007
- **Livnat G, Best LA, Guralnik L, Bentur L:** Pulmonary outcome of Alport syndrome with familial diffuse esophageal leiomyomatosis. *Pediatric pulmonology* 46 (6) (Juni): 614–616, 2011
- **Lüllmann-Rauch R:** Taschenlehrbuch Histologie. In 3. Aufl. Georg Thieme Verlag, 2009
- **Lyons OTA, St John ERC, Morales JP, Chan YC, Taylor PR:** Ruptured thoracoabdominal aortic aneurysm in a renal transplant patient with Alport's syndrome. *Annals of vascular surgery* 21 (6) (November): 816–818, 2007

- **Ma J, Pan X, Wang Z, Wang Y, Feng X, Ren H, Zhang W, Chen X, Wang W, Chen N:** Twenty-one novel mutations identified in the COL4A5 gene in Chinese patients with X-linked Alport's syndrome confirmed by skin biopsy. *Nephrology, dialysis, transplantation: official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* 26 (12) (Dezember): 4003–4010, 2011
- **Martin P, Heiskari N, Zhou J, Leinonen A, Tumelius T, Hertz JM, Barker D, Gregory M, Atkin C, Styrkarsdottir U, Neumann H, Springate J, Shows T, Petterson E, Tryggvason K:** High Mutation Detection Rate in the COL4A5 Collagen Gene in Suspected Alport Syndrome Using PCR and Direct DNA Sequencing. *Journal of the American Society of Nephrology* 9:2291-2301, 1998
- **Meloni I, Vitelli F, Pucci L, Lowry R, Tonlorenzi R, Rossi E, Ventura M et al.:** Alport syndrome and mental retardation: clinical and genetic dissection of the contiguous gene deletion syndrome in Xq22.3 (ATS-MR). *Journal of Medical Genetics* 39 (5) (Mai): 359–365, 2002
- **Nagel M, Nagorka S, Gross O:** Novel COL4A5, COL4A4, and COL4A3 Mutations in Alport Syndrome. *Human Mutations Mutation in Brief* 820, Online, 2005
- **Noel LH:** Renal Pathology and ultrastructural Findings in Alport's syndrome. *Renal failure* 22 (6): 751–758, 2000
- **Noone D, Licht C:** An update on the pathomechanisms and future therapies of Alport syndrome“. *Pediatric nephrology (Berlin, Germany)* Springer Verlag (August 18):1–12, 2012.
- **Payer B, Lee JT:** X chromosome dosage compensation: how mammals keep the balance“. *Annual review of genetics* 42: 733–772, 2008
- **Pescucci C, Mari F, Longo I, Vogiatzi P, Caselli R, Scala E, Abaterusso C et al.:** Autosomal-dominant Alport syndrome: natural history of a disease due to COL4A3 or COL4A4 gene. *Kidney international* 65 (5) (Mai): 1598–1603, 2004.
- **Prodromidi EI, Poulson R, Jeffery R, Roufosse CA, Pollard PJ, Pusey CD, Cook HT:** Bone Marrow-Derived Cells Contribute to Podocyte Regeneration and Amelioration of Renal Disease in a Mouse Model of Alport Syndrome. *STEM CELLS* 24 (11): 2448–2455, 2006
- **Sanger F, Nicklen S, Coulson AR:** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 74 (12) (Dezember): 5463–5467, 1977
- **Sessa A, Meroni M:** Alport's Syndrome. *Orphanet encyclopedia*, 2001
- **Spear GS, Slusser RJ:** Alport's Syndrome. *The American Journal of Pathology* 69 (2) (November): 213–224, 1972

- **Thiemann F, Cullen PM, Klein HG:** Leitfaden Molekulare Diagnostik: Grundlagen, Gesetze, Tipps und Tricks. *Wiley VCH Verlag GmbH*, 2006
- **Thodi C, Thodis E, Danielides V, Pasadakis P, Vargemezis V:** Hearing in Renal Failure. *Nephrology Dialysis Transplantation* 21 (11) (Januar 11): 3023–3030, 2006
- **Thüroff JW, Stein R, Beetz R:** Kinderurologie in Klinik und Praxis, 18 in 3. vollständig überarbeitete und erweiterte Aufl. Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 2011
- **Uliana V, Marcocci E, Mucciolo M, Meloni I, Izzi C, Manno C, Bruttini M et al.:** Alport syndrome and leiomyomatosis: the first deletion extending beyond COL4A6 intron 2. *Pediatric nephrology (Berlin, Germany)* 26 (5) (Mai): 717–724, 2011
- **Vitelli F, Piccini M, Caroli F, Franco B, Malandrini A, Pober B, Jonsson J, Sorrentino V, Renieri A:** Identification and Characterization of a Highly Conserved Protein Absent in the Alport Syndrome (A), Mental Retardation (M), Midface Hypoplasia (M), and Elliptocytosis (E) Contiguous Gene Deletion Syndrome (AMME). *Genomics* 55 (3) (Februar 1): 335–340, 1999
- **Wendler J, Seidner W, Eysholdt U:** Lehrbuch der Phoniatrie und Pädaudiologie, 61. in 4. völlig überarbeitete Aufl. *Georg Thieme Verlag*, 2005
- **Williamson DAJ:** Alport's syndrome of hereditary nephritis with deafness. *The Lancet* 278 (7216) (Dezember 16): 1321–1323, 1961
- **Xu JM, Zhang SS, Zhang Q, Zhou YM, Zhu CH, Ge J, Wang L:** Ocular manifestations of Alport syndrome. *International Journal of Ophthalmology* 3 (2) (Juni 18): 149–151, 2010

7 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Trippelhelix-Struktur der Typ-IV-Kollagen-Ketten	3
Abb. 2:	Aufbau eines Kollagen-Typ-IV-Netzwerkes	3
Abb. 3:	Elektronenmikroskopischer Befund bei Alport-Syndrom	9
Abb. 4:	Hamilton Chemagic STAR	17
Abb. 5:	Auswirkung der Magnetisierung und Rotierung der Nadel auf die <i>beads</i>	17
Abb. 6:	Patienten-Informationsschreiben (Jugendliche/Erwachsene)	28
Abb. 7:	Patienten-Informationsschreiben (Kinder)	29
Abb. 8:	Patienten-Informationsschreiben (Eltern)	30
Abb. 9:	Einverständniserklärung	31
Abb. 10:	Fragebogen (Seite 1)	32
Abb. 11:	Fragebogen (Seite 2)	33
Abb. 12:	Verteilung der Mutationen auf die Exons von <i>COL4A5</i>	37
Abb. 13:	Hämaturie bei Mutationen in <i>COL4A5</i>	51
Abb. 14:	Proteinurie bei Mutationen in <i>COL4A5</i>	54

8 Tabellenverzeichnis

Tab. 1:	Das Patientenkollektiv	36
Tab. 2a:	Nukleotidveränderungen und AS-Veränderungen in <i>COL4A5</i>	37
Tab. 2b:	Nukleotidveränderungen und AS-Veränderungen in <i>COL4A5</i> Nicht-miteinander verwandte Patienten mit gleicher Mutation	38
Tab. 3:	Nukleotidveränderungen und AS-Veränderungen in <i>COL4A4</i>	38
Tab. 4:	Nukleotidveränderungen und AS-Veränderungen in <i>COL4A3</i>	39
Tab. 5a:	Hämaturie bei Mutationen in <i>COL4A5</i>	50
Tab. 5b:	Isolierte Hämaturie bei Mutationen in <i>COL4A5</i>	51
Tab. 6:	Hämaturie bei Mutationen in <i>COL4A4</i>	52
Tab. 7:	Hämaturie bei Mutationen in <i>COL4A3</i>	53
Tab. 8:	Proteinurie bei Mutationen in <i>COL4A5</i>	54
Tab. 9:	Proteinurie bei Mutationen in <i>COL4A4</i>	55
Tab. 10:	Proteinurie bei Mutationen in <i>COL4A3</i>	55
Tab. 11:	Hörstörungen bei Mutationen in <i>COL4A5</i>	57
Tab. 12:	Hörstörungen bei Mutationen in <i>COL4A4</i>	57
Tab. 13:	Hörstörungen bei Mutationen in <i>COL4A3</i>	58
Tab. 14:	Augenveränderungen bei Mutationen in <i>COL4A5</i>	59
Tab. 15:	Augenveränderungen bei Mutationen in <i>COL4A4</i>	59
Tab. 16:	Augenveränderungen bei Mutationen in <i>COL4A3</i>	60
Tab. 17a:	Hypertonie bei Mutationen in <i>COL4A5</i>	61
Tab. 17b:	Hypertonie bei Patienten im Alter < 50 Jahre mit Mutationen in <i>COL4A5</i>	61
Tab. 18:	Hypertonie bei Mutationen in <i>COL4A4</i>	63
Tab. 19:	Hypertonie bei Mutationen in <i>COL4A3</i>	63
Tab. 20:	Zusammenfassung der Ergebnisse	64
Tab. 21:	Symptome und Mutationen der Patienten	65

9 Abkürzungsverzeichnis

ACE	<u>A</u> ngiotensin- <u>C</u> onverting- <u>E</u> nzym
AS	<u>A</u> lport- <u>S</u> yndrom
AT	<u>A</u> ngiotensin
BM	<u>B</u> ekannte <u>M</u> utation
ddNTP	<u>D</u> idesoxyribo <u>n</u> ukleosid <u>t</u> riphosphat
DMSO	<u>D</u> imethyl <u>s</u> ulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure, <u>d</u> eoxyribo <u>n</u> ucleic <u>a</u> cid
dNTP	<u>D</u> esoxyribo <u>n</u> ukleosid <u>t</u> riphosphat
EDTA	<u>E</u> thylendiamintetra <u>a</u> cetat
ESRD	<u>E</u> nd- <u>S</u> tage <u>R</u> enal <u>D</u> isease
GBM	<u>G</u> lomeruläre <u>B</u> asalm <u>m</u> embran
h	<u>h</u> eterozygot
H	<u>h</u> omozygot
HGMD	<u>H</u> uman <u>G</u> ene <u>M</u> utation <u>D</u> atabase
HMG-CoA	3- <u>H</u> ydroxy-3- <u>M</u> ethylglutaryl- <u>C</u> oenzym- <u>A</u>
HPLC	<u>h</u> igh <u>p</u> erformance <u>l</u> iquid <u>c</u> hromatography
m	<u>m</u> ännlich
MgCl ₂	<u>M</u> agnesium <u>c</u> hlorid
MLPA	<u>M</u> ultiplex <u>L</u> igation Dependent <u>P</u> robe <u>A</u> mplification
NC1-Domäne	<u>N</u> icht- <u>K</u> ollagen-Domäne
PCR	<u>P</u> olymerase- <u>K</u> etten <u>r</u> eaktion (<u>P</u> olymerase <u>C</u> hain <u>R</u> eaction)
RAAS	<u>R</u> enin- <u>A</u> ngiotensin- <u>A</u> ldosteron- <u>S</u> ystem
RBC	<u>r</u> ed <u>b</u> lood <u>c</u> ells
TBE-Puffer	<u>T</u> ris-Hydroxymethyl-Aminomethan- <u>B</u> orat- <u>E</u> DTA-Puffer
TBMN	<u>T</u> hin <u>B</u> asement <u>M</u> embrane <u>N</u> ephropathy
TGF	<u>T</u> ransforming growth <u>f</u> actor
UM	<u>u</u> nbekannte <u>M</u> utation
w	<u>w</u> eiblich
XLAS	<u>X</u> -linked <u>A</u> lport- <u>S</u> yndrom

10 Danksagung

Zum Abschluss dieser Arbeit möchte ich mich noch bei denjenigen bedanken, die mich begleitet und unterstützt haben. Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Lutz T. Weber, der mir vertrauensvoll dieses Forschungsprojekt überlassen hat und mir in den entscheidenden Momenten Mut zugesprochen hat.

Ganz besonders herzlich möchte ich auch Frau PD Dr. Julia Höfele danken, die mich auf dem Weg der Verwirklichung dieser Dissertation nicht nur begleitet hat, sondern auch viel Zeit und Mühe in die Betreuung dieser Arbeit steckte. Sie verhalf mir mit Anregungen und kritische Kommentaren, dieser Arbeit den letzten Feinschliff zu verpassen. Sie stand mir zu jeder Zeit mit Rat und Tat bei Seite und verstand es, mich durch ihre kompetente Betreuung zu motivieren und zu ermutigen. Vielen Dank dafür!

Des Weiteren möchte ich mich bei Herrn Dr. Hanns-Georg Klein und bei Frau Dr. Imma Rost bedanken, die mir die Möglichkeit boten, in ihrem Zentrum für Humangenetik und Laboratoriumsmedizin in Martinsried meine wissenschaftliche Arbeit durchzuführen. Ich bedanke mich außerdem bei dem gesamten Team im Labor für die ausgesprochen nette und harmonische Arbeitsatmosphäre. Insbesondere danke ich Frau Sabine Rath, die mich geduldig in die praktische Welt der Molekulargenetik einführte und mir dann zu jeder Zeit eine große Hilfe bei Methodenfragen war. Das gesamte Team stand mir bei Fragen immer hilfreich zur Seite.

Ein abschließender Dank gilt sämtlichen Patienten, die bereit waren, an der Studie teilzunehmen, sowie sämtlichen Ärzten, die sich die Zeit nahmen, mir klinische Informationen zu übermitteln. Ohne Ihr Mitwirken wäre ein Erstellen dieser Arbeit unmöglich gewesen! An dieser Stelle möchte ich zumindest Frau PD Dr. Weber, Frau Dr. Strasser, Frau Dr. Wahl, Frau Dr. Montoya und Frau Dr. Strobl-Wildemann erwähnen, denen neben all den anderen Ärzten mein Dank gebührt.

Zuletzt möchte ich mich noch bei meiner Familie danken, die mich nicht nur während des Dissertationsprojektes auf allen Ebenen unterstützte, sondern mir auch während meines Studiums und in ausnahmslos allen Lebensabschnitten Rückhalt in jeglicher Hinsicht bot.

12 Vorträge, Publikationen und Poster

Vorträge:

- **Sonja Beicht, Julia Hoefele, Marcus R. Benz, Hanns-Georg Klein, Bärbel Lange-Sperandio, Lutz T. Weber:** Genotyp-Phänotyp-Korrelation bei Alport-Patientinnen und Alport-Patienten. *Nephrologisches Forum München, Fellows' Night*, 10.07.2012. Auszeichnung über den 3. Platz
- **Sonja Beicht:** *Genotyp-Phänotyp-Korrelation bei Alport-Patienten*. Zentrum für Humangenetik und Laboratoriumsmedizin Dr. Klein, Dr. Rost und Kollegen. 35. Statusseminar: Nephrogenetik. Alport-Syndrom und Dünne Basalmembran-Nephropatie, 23.01.2013

Poster:

- **Sonja Beicht, Gertrud Strobl-Wildemann, Sabine Rath, Hanns-Georg Klein, Julia Hoefele:** Somatic Mosaicism in Alport Syndrome: Novel mutation in *COL4A5* gene. *Pediatr Nephrol* 27:1660, P36, 2012

Publikationen:

- **Beicht S, Strobl-Wildemann G, Rath S, Wachter O, Alberer M, Kaminsky E, Weber LT, Hinrichsen T, Klein HG, Hoefele J:** Next Generation Sequencing as a Useful Tool in the Diagnostics of Mosaicism in Alport Syndrome. *Gene*, accepted 2013

Eidesstattliche Versicherung

Beicht, Sonja

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

Genotyp-Phänotyp-Korrelation bei Alport-Patientinnen und Alport-Patienten

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Ort, Datum

Unterschrift
Doktorandin/Doktorand