

Niels Halama  
Dr. med.

## **Kandidatengen- und Mutationsanalyse bei diabetischer Nephropathie**

Geboren am 06.08.1977 in Göttingen  
Reifeprüfung am 13.06.1997 in Bensheim  
Studiengang der Fachrichtung Medizin vom WS 1998/1999 bis WS 2005/2006  
Physikum am 29.08.2000 an der Universität Heidelberg  
Klinisches Studium in Heidelberg  
Praktisches Jahr in Ludwigsburg und Ohio (USA)  
Staatsexamen am 16.11.2005 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Humangenetik  
Doktorvater: Prof. Dr. med. Claus R. Bartram

Die Diabetische Nephropathie (DN) ist in Europa und USA mit knapp 36% die Hauptursache für terminales Nierenversagen. Allein in den USA erklärt dies 24-30.000 neue dialysepflichtige Patienten pro Jahr. Dabei zeichnen sich besonders hohe Komplikationsraten für diabetische Dialysepatienten ab. Von allen Langzeitkomplikationen des Diabetes ist die diabetische Nephropathie die für den Patienten am meisten belastende und kostenintensivste Komplikation. Betrachtet man die genetischen Ursachen, so findet man viele Hinweise auf den Einfluss genetischer Faktoren bei der Entstehung der Erkrankung. Eine Vielzahl an neuen Strategien zur Erforschung der genetischen Determinanten steht zur Verfügung (z.B. Kandidatengenstrategie, positionelle Klonierung, Kopplungsanalysen), ebenso wie eine weiter zunehmende Anzahl an molekulargenetischen Techniken. Mehrere Kopplungsanalysen zeigen dabei eine transethnische Assoziation von DN mit einer Region auf dem langen Arm des Chromosoms 18 (bzw. 18q22.3-23).

Hauptthema dieser Arbeit war die Identifizierung potentieller Kandidatengene in der Region 18q22.3-23 und die Analyse des aussichtsreichsten Kandidatengens (ZNF236) mittels Mutationsscreening. Die Erstellung einer Transkript-Karte der Region 18q22.3-23 *in silicio* ergab einen Überblick über diesen bisher wenig untersuchten Abschnitt auf Chromosom 18. Einige bekannte Gene (wie MBP, CYB-5 etc.) liegen in dieser Region, aber zusätzlich fand sich noch eine größere Anzahl bisher wenig oder gar nicht charakterisierter Gene. Anhand von Datenbankabgleich („Data-Mining“), Literaturrecherche, Analysen mittels Gen- und Protein-Prediction-Software (wie GENSCAN von Chris Burge), Homologien zu anderen Sequenzen und Proteinen (z.B. zur Maus) und der Analyse vorhandener oder vorhergesagter alternativer Transkripte konnte eine umfassende Liste weiterer potentieller Kandidatengene erstellt werden. Auf der Basis der ermittelten Kandidatengene und der vorhandenen Publikationen wurde das Zinc-Finger-Gen 236 (ZNF236) als aussichtsreichster Kandidat ausgewählt und bei fünf Patienten (zwei Patienten türkischer und drei Patienten deutscher Herkunft) analysiert. Einer der beiden türkischen Patienten zeigt den Risiko-Haplotyp und DN, der andere weder den Risiko-Haplotyp noch DN (aber Diabetes mellitus Typ 2). Ebenso wurden drei deutschen Patienten untersucht, alle mit manifestem Diabetes mellitus Typ 2, bei zwei mittels Biopsie bestätigter DN. Das Gen ZNF236 hat eine Transkript-Größe von 5880 Basenpaaren und besteht dabei aus 32 Exons. Alle analysierten Polymorphismen waren mit normalen Transkripten assoziiert, außerdem fanden sich die entdeckten Varianten sowohl bei betroffenen Patienten als auch bei den Kontrollen. Ein in der Literatur vorbeschriebenes alternatives Transkript mit der Länge von 82 Basenpaaren konnte bestätigt werden. Daneben fand sich noch ein neues alternatives Transkript, das mit einem verkürzten Exon 9 einhergeht.

Dieses neue Transkript fand sich bei allen untersuchten Patienten und gesunden Kontrollen. Zusätzlich durchgeführte quantitative Transkriptanalysen zeigten ebenso keinen Unterschied zwischen betroffenen Patienten und Kontrollen. Die in dieser Arbeit dargelegte Vorgehensweise unterscheidet sich von der üblichen Herangehensweise dahingehend, dass nicht die genomische DNA der betroffenen Individuen untersucht wurde, sondern eine Analyse auf der Ebene der RNA (beziehungsweise der cDNA) durchgeführt wurde. Der Vorteil dieses Verfahrens liegt in der Möglichkeit, alternative Transkripte zu entdecken, die Promotorfunktion beider Allele zu beurteilen und daneben auch Mutationen im Exonbereich zu finden. Anhand der erhobenen Daten lässt sich die postulierte pathogenetische Bedeutung von ZNF236 in der Entstehung von DN nicht bestätigen. Weitere Kopplungsanalysen zur weiteren Einschränkung der (bisher 7 Megabasen großen) Region stellen eine Möglichkeit zur weiteren Untersuchung potentieller Kandidatengene dar.