

**Urologische Klinik und Poliklinik der Technischen Universität München
Klinikum rechts der Isar
(Direktor: Univ. Prof. Dr. R. Hartung)**

**Untersuchungen zur Bedeutung der Mutationen des
Cystic-Fibrosis-Transmembrane-Regulator (CFTR)-Gens
bei Patienten mit kongenitaler Samenleiteraplasie
unter besonderer Berücksichtigung der Nierenaplasie**

Maria Barbara Schwarz

**Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen
Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Medizin genehmigten Dissertation.**

**Vorsitzender: Univ.- Prof. Dr. D. Neumeier
Prüfer der Dissertation: 1. Univ.- Prof. Dr. R. Hartung
2. Univ.- Prof. Dr. Th. A. Meitinger**

**Die Dissertation wurde am 20.09.2005 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 17.05.2006 angenommen.**

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung
 - 1.1 Entdeckung und Identifizierung des CFTR- Gens
 - 1.2 Struktur und Expression des CFTR- Gens
 - 1.3 Das CFTR- Protein
 - 1.4 Mutationen im CFTR- Gen
 - 1.5 Molekulare Konsequenzen der CFTR- Mutationen
 - 1.5.1 Klasse 1: Synthesedefekte
 - 1.5.2 Klasse 2: Reifungsstörungen
 - 1.5.3 Klasse 3: Regulationsstörungen
 - 1.5.4 Klasse 4: Leitfähigkeitsstörungen
 - 1.5.5 Klasse 5: Eingeschränkte Synthese
 - 1.6 Vom Genotyp zum Phänotyp
 - 1.7 Die Cystische Fibrose
 - 1.7.1 Pulmonale Symptomatik der Cystischen Fibrose
 - 1.7.2 Gastrointestinale Symptomatik der Cystischen Fibrose
 - 1.7.3 Genitale Symptomatik der Cystischen Fibrose
 - 1.8 Die kongenitale Samenleiteraplasie
 - 1.8.1 Die Cystische- Fibrose- assoziierte kongenitale Samenleiteraplasie
 - 1.8.2 Die kongenitale Samenleiteraplasie mit Nierenbeteiligung
2. Material und Methoden
 - 2.1 Patientenkollektiv
 - 2.2 Anamnese und körperliche Untersuchung
 - 2.3 Bildgebende Diagnostik
 - 2.4 Histologische Untersuchung
 - 2.5 Hormonstatus
 - 2.6 Genetische Untersuchung
 - 2.7 Schweißtest

- 2.8 Therapiemöglichkeit
 - 2.8.1 Mikrochirurgische epididymale Spermienaspiration und testikuläre Spermienextraktion
 - 2.8.2 Aufbereitung der Biopsate
 - 2.8.3 Kryokonservierung
 - 2.8.4 Intrazytoplasmatische Spermieninjektion
- 3. Ergebnisse
 - 3.1 CFTR- Mutationen bei Patienten mit kongenitaler Samenleiteraplasie
 - 3.1.1 CFTR- Mutationen bei Patienten mit kongenitaler bilateraler Samenleiteraplasie
 - 3.1.2 CFTR- Mutationen bei Patienten mit kongenitaler unilateraler Samenleiteraplasie
 - 3.2 Patienten mit kongenitaler Samenleiteraplasie ohne CFTR- Mutation und ohne Nierenbeteiligung
 - 3.3 Patienten mit kongenitaler Samenleiteraplasie und Nierenbeteiligung
- 4. Diskussion
 - 4.1 Patienten mit kongenitaler Samenleiteraplasie und Mutationen im CFTR- Gen
 - 4.2 Patienten mit kongenitaler Samenleiteraplasie ohne Mutation im CFTR- Gen
 - 4.3 Nachweiswahrscheinlichkeit für CFTR- Mutationen
 - 4.3.1 Spektrum der untersuchten CFTR- Mutationen
 - 4.3.2 Herkunft des Patienten mit kongenitaler Samenleiteraplasie
 - 4.3.3 Nachweis von CFTR- Mutationen bei gleichzeitiger Nierenaplasie
 - 4.3.4 Nachweis von CFTR- Mutationen von CFTR- Mutationen bei Patienten mit kongenitaler unilateraler Samenleiteraplasie
- 5. Zusammenfassung
- 6. Referenzen

Anhang: Patientenübersicht

Danksagung

Verzeichnis der Abkürzungen

CAVD: congenital absence of the vas deferens

CBAVD: congenital bilateral absence of the vas deferens

CUAVD: congenital unilateral absence of the vas deferens

CF: cystic fibrosis

CFTR: cystic- fibrosis- transmembrane- regulator

ICSI: intracytoplasmatische Spermieninjektion

MESA: mikrochirurgische epididymale Spermienaspiration

TESE: testikuläre Spermienextraktion

1. Einleitung

1.1 Entdeckung und Identifizierung des CFTR- Gens

1953 wurden während einer Hitzewelle in New York zum ersten Mal stark erhöhte Elektrolyt- Werte des Schweißes (Natrium und Chlorid) bei Mukoviszidose- Patienten festgestellt (di Sant'Agnesse et al., 1953). Dieser schon früh vermutete Zusammenhang zwischen der veränderten Ionenzusammensetzung und der Mukoviszidose setzte den Grundstein für die Erforschung der Ursache einer der weltweit häufigsten Erbkrankheiten. Anfang der 80-er Jahre wurden Störungen im Natrium- und Chlorid-Transport respiratorischer Epithelzellen (Knowles et al., 1981; 1983) und ekkriner Schweißdrüsen (Quinton, 1983) von CF-Patienten nachgewiesen. Widdicombe entdeckte 1985 einen cAMP-abhängigen transepithelialen Chloridionenfluß in normalen, nicht aber in Epithelzellen von Mukoviszidose- Erkrankten (Widdicombe et al., 1985). Der Verdacht, es handle sich um eine Ionenkanalerkrankung, war also naheliegend (Frizzell, 1987).

Der nächste Schritt auf der Suche nach dem zugrundeliegenden Gendefekt bestand nun darin, mittels der Methode des positionalen Klonierens das Gen zu lokalisieren und identifizieren. Bei diesem Verfahren wird ein Gen kloniert, von dem nur die Zuordnung zu einer chromosomalen Teilregion bekannt ist, was früher auch als „reverse Genetik“ bezeichnet wurde. Durch gezielte Familienuntersuchungen und Kopplungsanalysen mit Restriktionsfragmentlängen- Polymorphismus- (RFLP-) Sonden wurde zunächst der Genort auf einen Bereich (7q31) des langen Arms von Chromosom 7 eingegrenzt (Knowlton et al., 1985; Tsui et al., 1985; Wainwright et al., 1985; White et al., 1985).

Abbildung 1: Schema des positionalen Klonierens des CFTR- Gens

Chromosomale Lokalisation	Klonierung	Identifizierung des CFTR- Gens	Klärung des Stoffwechseldefekts
Kopplungsanalysen in betroffenen Familien	chromosome walking chromosome jumping	Expressionsstudien Zoo blots Mutationen bei Betroffenen	CFTR- Protein- Funktionsstudien
1. Schritt	2. Schritt	3. Schritt	4. Schritt

(Stuhrmann et al., 1998)

Trotz einer intensiven weltweiten Suche gelang es lange Zeit nicht, CF- Patienten mit Bruchstellen einer Translokation, Inversion oder Deletion in der 7q31- q32 Region zu finden. Auch Mikrodeletionen konnten nirgendwo ausfindig gemacht werden- die Identifizierung des CFTR-Gens erwies sich mehr und mehr als ein mühsames Unterfangen: Erst nach einer aufwendigen genetischen Kartierung und einer umfassenden molekularen Charakterisierung der Kandidatenregion ließ sich das Gen isolieren. Ein großer Teil der Bemühungen galt dabei der Durchsuchung von genomischen DNA- Banken und der Durchführung einer Chromosomenwanderung (chromosome walking). Als effizientes Klonierungssystem auf Zellbasis erwiesen sich Lambda- Bakteriophagen und Cosmide, die als Vektoren fungieren, um mittellange (etwa 10 bis 40 kb) DNA- Fragmente zu klonieren. Mit Hilfe des sogenannten Chromosomenspringens (chromosome jumping) konnte die Suche beschleunigt werden, da man hierdurch zu neuen Startpunkten für anschließende Chromosomenwanderungen innerhalb der Kandidatenregion gelangte, bis schließlich der Großteil der Region 31- 32 auf dem langen Arm von Chromosom 7 erfasst war. Durch Expressionsstudien der dadurch erhaltenen genomischen Fragmente in den betroffenen Geweben sowie durch die Analyse entsprechender cDNA- Banken gelang es schließlich, das CFTR- Gen zu identifizieren (Riordan et al., 1989; Rommens et al., 1989; Kerem et al., 1989).

Letztlich stützte auch der Nachweis einer Deletion von drei Basenpaaren im Exon 10 dieses Gens bei der Mehrheit der Mukoviszidose - Patienten (Kerem et al., 1989) und

das gehäufte familiäre Auftreten dieser als $\Delta F508$ bezeichneten Mutation bei den Betroffenen die Vermutung, es handle sich bei dem identifizierten Gen um das an der Entstehung der Mukoviszidose maßgeblich beteiligte.

1.2 Struktur und Expression des CFTR- Gens

Das CFTR- Gen weist eine Länge von 250kb auf Chromosom 7q31 auf, es ist unterteilt in 27 Exons (38- 724 kb) und wird von Intronabschnitten unterschiedlichster Länge (1- 40 kb) unterbrochen (Zielenski et al., 1991). Die 27 Exons waren ursprünglich mit den Bezeichnungen 1 bis 24 versehen, im nachhinein wurde aber festgestellt, dass die Exons 6, 14 und 17 nochmals durch Intronsequenzen unterteilt sind.

Die Expression des Gens erfolgt unter einer komplexen zellulären Kontrolle, wobei die höchsten Mengen an CFTR- mRNA in Pankreas, Darm, Leber, Niere, Schweißdrüsen und Reproduktionsorganen festgestellt wurden (Riordan et al., 1989). In der Lunge wird das CFTR- Gen nur in spezifischen Zellsubpopulationen, vor allem in sekretorischen Zellen der engen Atemwege und in submukösen Drüsen exprimiert. Die funktionelle CFTR- mRNA ist etwa 6.2 kb lang und kodiert für ein Protein von 1480 Aminosäuren, wobei durch alternatives Spleißen Transkripte abweichender Zusammensetzung erzeugt werden können. Am häufigsten wurden mRNA- Varianten beobachtet, denen Exon 4, 9 oder 12 fehlt.

1.3 Das CFTR- Protein

Die Sequenz der 1480 Aminosäuren erlaubt die Zuordnung des CFTR- Proteins zur Familie der Transportproteine, die als ATP- binding- cassette (ABC)- Transporter zusammengefasst werden (Dean et al., 1995; Higgins, 1995). ABC- Transporter weisen zwei strukturell und funktionell verschiedene Module auf, und zwar eine hydrophobe Transmembrandomäne (TMD) mit meist sechs membranspannenden Helices, die einen Kanal durch die Zellmembran bilden, und eine hydrophile Bindungsdomäne für Nucleosidtriphosphate (NBD), die vermutlich die Energie für den Substrattransport bereitstellt. Bei den eukaryontischen ABC Proteinen liegen gewöhnlich die TMD sowie die NBD auf einer gemeinsamen Peptidkette vor, wobei die NBD der TMD carboxyterminal folgt. Das CFTR- Protein setzt sich aus zwei TMD- NBD Modulen zusammen, die über eine regulatorische Domäne („R- Domäne“) verbunden sind. Ein Funktionsausfall in ABC- Transportergenen spielt nicht nur bei der Entstehung der Mukoviszidose eine wichtige Rolle, auch bei anderen erblichen Erkrankungen wie Adrenoleukodystrophie, Dubin- Johnson- Syndrom oder Hypoglykämie mit Hyperinsulinismus hat die verminderte Expression der ABC- Proteine große Bedeutung. Auf der Grundlage dieses beobachteten Basisdefekts der Mukoviszidose, nämlich der Störung des transmembranalen Chloridtransports, wurden zwei Hypothesen zur Funktion des CFTR- Proteins aufgestellt: entweder stellt CFTR den Regulator eines Chloridkanals dar, oder es bildet selbst einen Chloridkanal. Mit Hilfe von Mutagenese- Experimenten in der Transmembranregion des CFTR- Proteins, die zu Veränderungen in der Ionenselektivität führten konnte letztere Hypothese gestützt werden (Anderson et al., 1991). Außerdem wurde nach funktioneller Rekonstitution von im Baculovirus- Insektenzellsystem exprimiertem CFTR- Protein ein Proteinase- A- aktivierter Chloridionenfluß gemessen (Kartner et al., 1991). Insbesondere durch die Studien zur Expression von CFTR in verschiedenen heterologen Systemen sowie durch eine zellfreie Rekonstitution in Phospholipidvesikeln, die stets zum Auftreten einer durch cAMP stimulierbaren Chloridionenleitfähigkeit führte, ist die Funktion des CFTR- Proteins als Anionenkanal heute gut belegt (Riordan et al., 1993; Welsh et al., 1993). Zahlreiche immunologische Experimente zur Lokalisation des CFTR- Proteins in verschiedenen Geweben und Zelllinien ergaben, dass das native Protein vorwiegend in der apikalen Membran komplett differenzierter Epithelzellen anzutreffen ist (Zeitlin et al.,

1992). Die hydrophoben Transmembrandomänen formen eine Ionenpore, die nach streng regulierter Öffnung von mehreren Chloridionen gleichzeitig in Richtung des elektrochemischen Gradienten passiert werden kann. Die Stimulation dieser CFTR-Funktion wird durch cAMP, cGMP oder die entsprechenden Rezeptoragonisten vorbereitet, und zwar über eine Phosphorylierung der regulatorischen R- Domäne durch die cAMP abhängige Proteinkinase (PKA). Diese regulatorische Domäne scheint dabei wie eine Art „Schlüsselsicherung“ zu funktionieren, denn ihre Phosphorylierung ist für die Freigabe des Ionenkanals notwendig, nicht jedoch hinreichend für dessen Öffnung. Die nun phosphorylierte Form von CFTR kann erst in einem separaten Mechanismus durch die Bindung von ATP über die Nukleotidbindungsdomänen, NBD1 und NBD2, geöffnet werden. ATP Bindungs- und Hydrolyseschritte scheinen dabei zunächst über NBD1 eine aktivierende Konformationsänderung des phosphorylierten CFTR zu bewirken und anschließend über NBD2 die Öffnungsdauer des Ionenkanals zu steuern (Gunderson et al., 1995).

Neben der Funktion als Anionenkanal werden durchaus weitere Funktionen diskutiert: es liegen Berichte über die Beteiligung von CFTR an der Regulation der Endo- und Exocytose in Epithelien (Bradbury et al., 1992), am Transport von Wasser und Harnstoff (Hasegawa et al., 1992), an der Sialisierung und Sulfatierung von Muzinen, an der cAMP abhängigen Regulation von Natriumkanälen (Stutts et al., 1995) und an der Regulation sogenannter auswärts gerichteter Chloridkanäle (outwardly rectifying depolarization chloride channels, ORDICs) mittels eines ATP involvierenden autokrinen Mechanismus (Schwiebert et al., 1995) vor. Letztere Funktion scheint allerdings nur an Einzelzellen, nicht an Zellverbänden eine Rolle zu spielen (Xia et al., 1997). Vermutlich konnten bislang längst nicht alle Funktionen des Cystic- Fibrosis- Transmembrane- Regulator aufgeklärt werden.

1.4 Mutationen im CFTR- Gen

Seit Entdeckung der Deletion $\Delta F508$ im Jahre 1989 (Kerem et al., 1989) sind im Rahmen des Cystic Fibrosis Genetic Analysis Consortium mehr als 700 verschiedene krankheitsverursachende Mutationen im CFTR- Gen durch die weltweite Mitarbeit von über 100 Forschergruppen identifiziert worden. Interessierten Wissenschaftlern steht inzwischen eine Datenbank mit ständig aktualisierter Auflistung aller bisher detektierten Mutationen zur Verfügung (<http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr/>).

Es handelt sich bei etwa der Hälfte der Mutationen im CFTR- Gen um Missense-Mutationen, was einer nichtsynonymen Substitution entspricht, die ein Codon so verändert, dass es für eine andere Aminosäure steht. Man unterscheidet zwei Arten von Missense- Mutationen:

- Eine konservative Substitution ersetzt eine Aminosäure durch eine andere, chemisch verwandte. Die Auswirkungen einer solchen Substitution sind häufig gering, da die Seitenkette der neuen Aminosäure in der Funktion der Ersetzten entspricht. Der genetische Code hat sich offensichtlich so entwickelt, dass der Effekt von Basensubstitutionen so gering wie möglich gehalten wird, da ähnliche Codons für verwandte Aminosäuren stehen.
- Eine nicht konservative Substitution allerdings führt zum Austausch einer Aminosäure gegen eine andere mit unterschiedlicher Seitenkette. Verändert sich hierdurch die elektrische Ladung, beispielsweise wenn eine polare Seitenkette durch eine nichtpolare ersetzt wird oder umgekehrt, so hat dies schwerwiegendere Auswirkungen auf das entstehende Protein.

Zudem treten Nonsense- Mutationen auf, ebenfalls nichtsynonyme Substitutionen, bei der ein für eine bestimmte Aminosäure spezifisches Codon durch ein Stopcodon ersetzt wird. Da solche Mutationen die Genfunktion immer deutlich herabsetzen, sorgt der Selektionsdruck in der Regel dafür, dass sie nur selten auftreten.

Daneben werden noch Frameshift- Mutationen, bei denen es zum Verschieben des Leserasters kommt beschrieben. Folge davon sind Veränderungen in der entstehenden Aminosäuresequenz und möglicherweise ein Funktionsverlust des Proteins.

Auch Spleißmutationen werden gefunden, die meist konservierte Sequenzen betreffen, die für einen normalen Spleißvorgang notwendig sind. Bei vielen Genen gibt es schon unter normalen Bedingungen alternative Formen des RNA- Spleißens, darüber hinaus können jedoch Mutationen zu einem fehlerhaften Spleißen führen, was pathogenetische

Auswirkungen haben kann, da auf diese Weise ganze Exons nicht in die reife RNA übernommen werden. In anderen Fällen führt das fehlerhafte Spleißmuster nur zum Ausschluß einer Exonteilsequenz, oder es entstehen ganz neue Exonsequenzen.

Deletionen einzelner Codons treten gelegentlich auf, größere Deletionen sind eher selten (Morrall et al., 1994), und große Insertionen wurden noch nie gefunden, vermutlich da sie in der codierenden DNA generell ausgesprochen selten vorkommen: eine solche Mutation ruft oft die Verschiebung des Leserasters hervor und kann deshalb pathogen sein, da sich ab dieser Mutationsstelle die Aminosäuresequenz vollständig verändert und die Polypeptidsynthese vorzeitig an einem Stopcodon, das in dem neuen Raster entstanden ist, abbricht. Selbst wenn Deletionen oder Insertionen zu keiner Rasterverschiebung führen, können sie die Genfunktion häufig beeinträchtigen, zum Beispiel wenn eine wichtige codierende Sequenz dadurch einfach verloren geht (aus „Molekulare Humangenetik“, Spektrum Lehrbuch, Strachan et al., 1996).

Obwohl in allen Exons des CFTR- Gens Mutationen nachgewiesen werden konnten, scheint die Verteilung der Mutationen nicht zufällig erfolgt zu sein. Insbesondere im Bereich der Exons 4,7,11,17b und 20 finden sich überproportional viele Mutationen, wobei es sich dabei vornehmlich um Missense- Mutationen handelt. Möglicherweise ist dies als Hinweis auf die funktionelle Wichtigkeit dieser Proteindomänen zu sehen. In einigen Codons finden sich mehrere verschiedene Punktmutationen, zum Beispiel in den Codons 117, 347 und 549. Diese sogenannten Mutations- hot- spots beinhalten meist ein CpG- Nukleotid, also eine DNA- Sequenz, die besonders anfällig für Punktmutationen ist (Cooper et al., 1990).

Die meisten der pathogenen Mutationen im CFTR- Gen sind sehr selten; oft wird die jeweilige Mutation nur in einer Familie beobachtet. Einige Mutationen jedoch kommen weltweit oder auch regional häufig vor und werden daher in die jeweiligen molekulargenetischen Diagnostik- Schemata einbezogen.

Tabelle 1: Häufige Mutationen im CFTR- Gen

Mutation	Lokalisation	Nukleotid-	Codon- Austausch	Referenz
----------	--------------	------------	------------------	----------

		Austausch		
R117H	Exon 4	G>A bei 482	Arg> His bei 117	Dean et al., 1990
621+1G>T	Intron 4	G>T bei 621+1	Spleißfehler	Zielinski et al., 1991
dI507	Exon 10	3bp Deletion 1648-1653	Isoleucin deletiert	Kerem et al., 1990
dF508	Exon 10	3bp Deletion 1652-1655	Phenylalanin deletiert	Kerem et al., 1989
1717-1G>A	Intron 10	G>A bei 1717-1	Spleißfehler	Kerem et al., 1990
G542X	Exon 11	G>T bei 1756	Gly> Stop bei 542	Kerem et al., 1990
S549N	Exon 11	G>A bei 1778	Ser> Asn bei 549	Cutting et al., 1990
G551D	Exon 11	G>A bei 1784	Gly> Asp bei 551	Cutting et al., 1990
R553X	Exon 11	C>T bei 1789	Arg> Stop bei 553	Cutting et al., 1990
R560T	Exon 11	G>C bei 1811	Arg> Thr bei 560	Kerem et al., 1990
W1282X	Exon 20	G>A bei 3978	Trp> Stop bei 1282	Vidaud et al., 1990
N1303	Exon 21	C>G bei 4041	Asn>Lys bei 1303	Osborne et al., 1991

Arg= Arginin, His= Histidin, Gly= Glycin, Ser= Serin, Asn= Asparagin, Asp= Asparaginsäure, Thr= Threonin, Trp= Tryptophan, Lys= Lysin

Die weltweit häufigste Mutation ist die oben erwähnte Deletion von drei Basenpaaren im Exon 10 des CFTR- Gens, die zum Verlust der Aminosäure Phenylalanin an der Position 508 der Proteinsequenz führt und somit als dF508 bezeichnet wird. DF508 findet sich weltweit auf ungefähr 70% aller untersuchten CF- Allelen, mit deutlichen Unterschieden

in der Häufigkeit dieser Mutation in verschiedenen Populationen: innerhalb Europas lässt sich ein deutlicher Nord/ Süd- Gradient nachweisen (European Working Group on Cystic Fibrosis, 1990): die Frequenz sinkt von 86,8% der CF- Allele in Dänemark über 78,5% in Großbritannien (Schwartz et al., 1990), 77,3% in Deutschland (Reis et al., 1990), 67% in der ehemaligen Tschechoslowakei (Macek et al., 1990) auf 27% in der Türkei (Hundrieser et al., 1990). Durch ausführliche genetische Analysen zur Verbreitung der Mutation $\Delta F508$ und der mit ihr assoziierten Mikrosatelliten- Polymorphismen in verschiedenen europäischen Ländern gelangte man im Rahmen einer internationalen Kooperation zu der Schlussfolgerung, dass $\Delta F508$ als älteste bekannte CFTR- Mutation noch zu Lebzeiten der Neandertaler, also vor mehr als 50.000 Jahren entstanden sein muss (Morral et al., 1994).

Neben der häufigsten Mutation $\Delta F508$ finden sich in den verschiedenen Bevölkerungsgruppen Europas noch eine Vielzahl weiterer Mutationen. In Deutschland konnten bereits über 70 weitere CFTR- Mutationen, zumeist Nukleotidsubstitutionen oder kleine Deletionen und Insertionen im kodierenden Bereich des CFTR- Gens nachgewiesen werden, wobei keine der non- $\Delta F508$ Mutationen eine Frequenz von mehr als 2,5% erreicht.

Tabelle 2: Mutationsverteilung bei 577 Patienten aus Deutschland

Mutation	Exon/ Intron	Allele	Häufigkeit

Q39X	Exon 2	1	0,1%
R347P	Exon 7	21	1,8%
dF508	Exon 10	830	71,9%
1717-1G>A	Intron 10	12	1,0%
G542X	Exon 11	16	1,4%
G551D	Exon 11	14	1,2%
R553X	Exon 11	22	1,9%
2183AA>G	Exon 13	5	0,4%
2789+5G>A	Intron 14b	10	0,9%
3272-26A>G	Intron 17a	11	1,0%
R1162X	Exon 19	2	0,2%
3849+10kbC>T	Intron 19	14	1,2%
N1303K	Exon 21	29	2,5%
Andere/unbekannt		167	14,5%

Die Patienten entstammen dem von Dörk et al., 1994 publizierten Patientenkollektiv und Patienten aus dem Hannoveraner Kollektiv, wobei stets nur ein Betroffener pro Familie angeführt wurde (Dörk et al., 1996).

1.5 Molekulare Konsequenzen der CFTR- Mutationen

Die molekularen Konsequenzen der Mutationen im CFTR- Gen sind je nach Art und Lokalisation recht vielseitig. Eine ursprüngliche Einteilung wurde später noch nach physiologischen Konsequenzen erweitert (Welsh et al., 1993; Zielenski et al., 1995), mittlerweile wird davon ausgegangen, dass es fünf verschiedene Klassen von Mutationen gibt, die zu einer massiven Reduktion der Menge an CFTR- Protein (Klasse 1), zu einer Reifestörung des CFTR- Proteins (Klasse 2), zu einer Blockierung der Regulation der Kanalöffnung (Klasse 3), zur Störung der Leitfähigkeit des Anionenkanals (Klasse 4), oder zu einer eingeschränkten Synthese des CFTR- Proteins (Klasse 5) führen.

1.5.1 Klasse 1: Synthesedefekte

Fast die Hälfte aller bekannten CFTR- Mutationen führen zu einer drastischen Verringerung der Menge oder Veränderung der Zusammensetzung der CFTR- mRNA. Stopmutationen (etwa 18% aller CFTR- Mutationen), Leserastermutationen (22%) oder Spleißmutationen (8%) verhindern generell die Bildung eines vollständigen Proteins. Durch Stop- und Leserastermutationen wird dabei nicht nur ein vorzeitiges Terminationssignal für die Proteinsynthese erzeugt, sondern meist bereits die Stabilität der CFTR- mRNA massiv reduziert. Diese Transkriptinstabilität als Folge eines vorzeitigen Terminationscodons ist ein Phänomen, das bei einer Vielzahl anderer Gene beobachtet werden konnte. Vermutlich besitzen eukaryontische Zellen einen noch nicht näher charakterisierten Erkennungsmechanismus, um bereits im Zellkern den Leserahmen einer m-RNA zu kontrollieren und sich vor den potentiell toxischen Folgen fehlgespleißter oder verkürzter Genprodukte durch den Abbau der mRNA mit vorzeitigen Terminationscodons zu schützen (Stuhrmann et al., 1998).

Durch umfangreiche Transkriptionsanalysen konnten bereits zwölf Stop- und Leserastermutationen nachgewiesen werden, die mit einer erheblichen CFTR- mRNA-Reduktion einhergehen (Will et al., 1996). Es wurde der prozentuale Anteil des mRNA-Spiegels von Allelen mit Nonsense- Mutationen mit dem CFTR- mRNA- Spiegel des Wildtyps verglichen und somit der Nachweis erbracht, dass es sich bei den Mutationen Q39X, E60X, R75X, E92X, G542X, R553X, L719X, Y1092X, S1196X und W1282X um Klasse 1 Mutationen handelt.

1.5.2 Klasse 2: Reifungsstörungen

Wie viele andere Membranproteine unterliegt auch das CFTR- Protein einem komplexen Reifungsprozess, der mit einer Glykosilierung und Faltung des Proteins im endoplasmatischen Retikulum (ER) und weiterer Glykosilierung im Golgi- Apparat einhergeht, bevor das reife CFTR- Protein seinen Wirkungsort, die Apikalmembran der Epithelzelle, erreicht. In einer ATP- abhängigen Reaktion erreichen nur 20% bis 50% des CFTR- Proteins der Wildtypsequenz eine stabile Konformation, die eine weitere Glykosilierung und den Transport an den Wirkungsort erlaubt; hieraus kann geschlossen werden, wie kompliziert und störanfällig der Reifungsvorgang ist.

Die Mutation dF508 ist mit einer Reifungsstörung des CFTR- Proteins verbunden und kann inzwischen als Paradigma für einen temperatursensitiven Defekt in der Prozessierung eines Membranproteins angesehen werden (Thomas et al., 1995): fehlt die Aminosäure Phenylalanin, wie es bei der dF508 Mutation der Fall ist, kann das CFTR- Protein nicht vollständig glykosiliert werden und nicht an die Apikalmembran gelangen (Cheng et al., 1990; Denning et al., 1992). Offenbar wird die Deletion von einem intrazellulären Kontrollmechanismus erkannt, der das missgefaltete und noch unvollständig glykosilierte dF508 CFTR im ER zurückhält (Lukacs et al., 1994; Ward et al., 1994). Solche Proteinfaltungs- und Reifungsstörungen finden sich nachgewiesenermaßen auch bei der Mutation dI507, sowie bei einigen Aminosäuresubstitutionen, wie der seltenen Mutation G480C und den Mutationen N1303K, S549I, S549R und A559T (Welsh et al., 1993).

Die genannten Mutationen führen alle dazu, dass das entsprechende Protein nicht vollständig glykosiliert wird- es konnte bisher noch keine Klasse 2 Mutation nachgewiesen werden, die zwar zu einer vollständigen Glykosilierung, nicht aber zu einem korrekten Transport an die Apikalmembran führt (Stuhrmann et al., 1998). Die Glykosilierung scheint somit Voraussetzung für das Erfolgen des Transports zu sein.

1.5.3 Klasse 3: Regulationsstörungen

Diese CFTR- Mutationen gehen zwar mit einer nachweislich intakten Prozessierung, dafür aber gestörten Regulation einher und betreffen ausschließlich die beiden Nukleotidbindungsdomänen (Welsh et al., 1993). Das Ausmaß des Funktionsausfalls durch eine Mutation im ATP- Bindungsmotiv hängt wesentlich von der Art des Aminosäureaustauschs ab. Die Regulation des Ionenkanals wird durch die Substitution G551D viel stärker beeinträchtigt als durch die an der gleichen Position physiologisch vorkommenden Mutationen G551S, G1244E und G1349D (Gregory et al., 1991; Anderson et al., 1992) und auch durch die Mutation S1255P wird die Antwort auf ATP- Stimulation vermindert (Anderson et al., 1992).

Das CFTR- Protein wird auch über eine Phosphorylierung der R- Domäne reguliert; hierzu sind aber kaum krankheitsverursachende Mutationen bekannt, da die zahlreichen Phosphorylierungsstellen von CFTR vermutlich degeneriert und teilweise redundant sind, so dass einzelne Mutationen die Regulation dort nicht nachhaltig beeinflussen (Stuhrmann et al., 1998).

1.5.4 Klasse 4: Leitfähigkeitsstörungen

Durch verschiedene Aminosäuremutationen und den damit verbundenen Ladungsänderungen in den Transmembranregionen werden Leitfähigkeitsveränderungen innerhalb oder am Rande einer der sechs Transmembranhelices (TM1- 6) verursacht. Besonders häufig werden diese Missense-Mutationen in der sechsten transmembranalen Helix der aminoterminalen TMD und in der ersten intrazytoplasmatischen Schleife der carboxyterminalen TMD identifiziert. Durch Expressionsstudien in heterologen Epithelzellen konnte gezeigt werden, dass insbesondere Lysin 95, Arginin 117, Arginin 334, Lysin 335, und Arginin 347 wichtige Aminosäuren der CFTR- Pore darstellen: die Substitution dieser Aminosäuren durch gezielte Mutagenese reduziert die Zahl der transportierten Ionen oder verändert die Ionenselektivität (Sheppard et al., 1993). Die Mutationen R117C, R117H, R334W, I336K und R347P verändern die Ladungen an diesen oder benachbarten Positionen und beeinträchtigen daher die Leitfähigkeitseigenschaften des Chloridkanals in unterschiedlichem Maße. Die Regulation der CFTR- Proteine mit Klasse 4 Mutationen mittels PKA- abhängiger Phosphorylierung und intrazellulärem ATP scheint normal zu

sein. Einen besonders großen Anteil an Klasse 4 Mutationen fanden sich bei der Untersuchung von CAVD- Patienten, insbesondere die R117H- Mutation wird in engem Zusammenhang mit der angeborenen Samenleiteraplasie gesehen; relativ viele CAVD-Betroffene sind compound heterozygote oder homozygote Träger dieser Mutation (Bienvenu et al., 1993; Gervais et al. 1993; Williams et al., 1993).

1.5.5 Klasse 5: Eingeschränkte Synthese

In diese Klasse fallen alle Mutationen, die zu einem normal funktionierenden, jedoch in der Menge reduzierten CFTR- Protein führen. Meist werden alternativ gespleißte Transkripte generiert, das bekannteste Beispiel hierfür ist die weit innerhalb des Introns 19 des CFTR- Gens lokalisierte Nukleotidsubstitution 3849+10kB C>T (Highsmith et al., 1994). Durch diesen Einzelbasenaustausch C> T, der etwa 10.000 Nukleotide vom nächsten Exon entfernt in der Sequenz G/gcgagt stattfindet, entsteht eine Donorspleißstelle und somit wird der fälschliche Einbau einer normalerweise nicht genutzten 84 Nukleotid langen Intronsequenzen die CFTR- mRNA aktiviert. Mit diesem neuen „Exon“ wird nun nicht nur die funktionelle mRNA- Sequenz unterbrochen, es wird auch ein vorzeitiges Stopcodon eingeführt und die Folge davon ist eine deutliche Verringerung des Transkriptionsprodukts. Diese mutationsbedingte Spleißstelle wird aber nur ineffizient genutzt, so dass dieses falsche „Exon“ mit dem Stopcodon nicht in allen Transkriptmolekülen gefunden wird und sogar bei homozygoten Trägern der Mutation 3849+10kB C>T noch mit einem Anteil von etwa 8% normal gespleißte mRNA nachgewiesen werden kann, die dann normal prozessiert wird (Highsmith et al., 1994).

Weitere Spleißmutationen stellen die Basenaustausche 1898+5G>T und 2789+5G>A dar. Um einen Sonderfall einer Klasse 5 Mutation handelt es sich bei der sogenannten 5T- Variante im Polypyrimidintrakt des Introns 8 IVS8-5T des CFTR- Gens. Die Länge dieses polymorphen Polypyrimidintrakts (5, 7 oder 9 Thyminbausteine) beeinflusst entscheidend die Effizienz der Erkennung des Exons 9: Individuen mit einer 7T- oder 9T- Folge bauen das Exon 9 in 70 bis 100% ihrer CFTR- mRNA- Transkripte ein, während bei solchen mit der 5T- Variante der Anteil der vollständigen mRNA auf 10 bis 40% sinkt (Chu et al., 1993). Fehlt nun der von Exon 9 kodierte Anteil im CFTR- Gen, so resultiert bei Trägern der IVS8- 5T- Variante eine Reduktion funktionsfähigen CFTR- Proteins.

In der Allgemeinpopulation findet sich diese Spleißvariante mit einer Frequenz von etwa 5%, besonders bei CAVD- Patienten wird diese Mutation allerdings gehäuft beobachtet. Auf bis zu 27% der Chromosomen von Betroffenen einer CAVD lässt sich die IVS8-5T-Mutation nachweisen, weshalb sie mit der Entstehung der angeborenen Samenleiteraplasie in ursächlichen Zusammenhang gebracht wird (Zielenski et al., 1995).

1.6 Vom Genotyp zum Phänotyp

Das CFTR- Protein wurde charakterisiert als ein Transmembranprotein, das die Funktion eines cAMP- abhängigen Anionenkanals ausübt (Miller, 1993).

Der Verlust oder die Verringerung dieser Eigenschaft als Chloridkanal ist verantwortlich für den Großteil der klassischen klinischen Symptome der Mukoviszidose. Neben der fehlenden Ansäuerung intrazellulärer Kompartimente in Epithelzellen der CF- Patienten spielt zudem der gestörte Elektrolyt- Transport eine wichtige Rolle: dieser führt zur Steigerung der Viskosität des in den verschiedenen betroffenen Organen produzierten Schleims. Zudem wird die mukoziliäre Clearance erheblich eingeschränkt, was vor allem die pulmonale Ausprägung der Mukoviszidose erklärt. Selbst die aufgrund obstruktiver Azoospermie bestehende Infertilität kann theoretisch auf dieses Phänomen zurückgeführt werden: der Verschluss des Wolffschen Ganges wird wohl durch zähflüssige Sekrete bedingt und verursacht die Degeneration desselben, was sowohl eine angeborene Samenleiteraplasie als auch eine Obstruktion des distalen Teils des Nebenhodens bedingen kann. Insgesamt hängt das Ausmaß und der Schweregrad der Erkrankung natürlich mit der Art der Mutation im Sinne der oben beschriebenen fünf Klassen zusammen.

1.7 Die Cystische Fibrose

Bei der Cystischen Fibrose (CF), auch Mukoviszidose genannt, handelt es sich um eine der weltweit häufigsten autosomal- rezessiv vererbaren Erkrankungen. Für die deutsche sowie für den Großteil der kaukasischen Populationen wird von den meisten Autoren eine durchschnittliche Häufigkeit von 1:2500 genannt, was einer Heterozygotenfrequenz von 4% entspricht. Weltweit finden sich allerdings große Unterschiede in der Häufigkeitsverteilung bei verschiedenen Populationen (Tabelle 3).

Tabelle 3: Mukoviszidose in verschiedenen Populationen

Land/ Region:	Häufigkeit/ Neugeborene:
Bretagne	1/ 380 bis 1/ 1800
Nordirland	1/ 1700 bis 1/ 1900
Italien	1/ 2000
USA (Kaukasier)	1/ 1900 bis 1/ 3700
England (Kaukasier)	1/ 2400 bis 1/ 3000
Deutschland	1/ 3300
England (Asiaten)	1/ 10000
USA (Afro- Afrikaner)	1/ 17000
USA (Hawaiianer)	1/ 90000

(Welsh et al.,1995)

Es handelt sich bei der Cystischen Fibrose um eine generalisierte Störung der Ausscheidung von Drüsensekreten im Sinne einer Exokrinopathie. Ursache ist das Versagen eines intrazellulären Enzymmechanismus mit resultierender Zähflüssigkeit der Sekrete und sekundären Veränderungen der Drüsen. Das Manifestationsalter und der

Schweregrad dieser Erkrankung sind äußerst variabel. Während in manchen Fällen die Diagnose aufgrund eines Mekoniumileus bereits intrauterin oder kurz nach der Geburt gestellt wird und schwere Komplikationen einer Infektion der Atemwege auch heute noch zum frühen Versterben der Betroffenen führen können, wird in anderen Fällen die Diagnose erst im mittleren bis späten Erwachsenenalter gestellt. Ein Charakteristikum, das für diagnostische Zwecke Bedeutung hat, stellt der veränderte Ionengehalt im Schweiß dar: die erhöhte Natrium und Chlorid- Konzentration ist auf Funktionsänderungen der ekkrinen Schweißdrüsen zurückzuführen. Mit Hilfe der Pilocarpin- Iontophorese (Schweißtest) kann die aufgrund der klinischen Symptomatik gestellte Verdachtsdiagnose gesichert werden.

1.7.1 Pulmonale Symptomatik der Cystischen Fibrose

In den meisten Fällen treten erste Symptome der Mukoviszidose in der Kindheit auf, wobei die Erkrankung der Lungen sehr oft das klinische Erscheinungsbild dominiert. Die Sekretion eines hochviskösen Schleims (daher die Bezeichnung Mukoviszidose: mucos, griech: Schleim) behindert die ziliäre Clearance und fördert die chronische Besiedelung der Lunge mit opportunistischen Erregern wie Staphylokokken und Pseudomonaden. Während Infektionen mit Staphylokokken (*S. aureus* und *S. pneumoniae*) und *Haemophilus influenzae* vorwiegend bei jüngeren Patienten auftreten, kommen solche mit Pseudomonaden (*P. aeruginosa* und/ oder *P. cepacia*) erst zu einem späteren Zeitpunkt der Erkrankung vor. Insbesondere das üblicherweise wenig pathogene gram-negative Stäbchenbakterium *Pseudomonas aeruginosa* wird bei Betroffenen nicht regulär durch die Bronchialepithelzellen aufgenommen und unschädlich gemacht, sondern kapselt sich im weiteren Verlauf einer chronischen Infektion in Mikrokolonien innerhalb des Mukus („Alginatbildung“) praktisch unangreifbar ein (Hoiby et al., 1990): die körpereigene Immunabwehr kann die Erreger somit nur unzureichend bekämpfen. In den letzten Jahren kam es vermehrt zu zusätzlichen Infektionen mit *P. cepacia*, die mitunter das Fortschreiten der Lungenerkrankung erheblich beschleunigen (LiPuma et al., 1990). Letztendlich führt der Teufelskreis aus chronischer Lungenentzündung, inadäquater Immunabwehr und progressiver destruktiver Bronchitis zum Verlust der Lungenfunktion. Den kritischen Ausgangspunkt hierfür stellt wohl die Empfänglichkeit

der Mukoviszidose- Patienten für *Pseudomonas aeruginosa* dar. Dieses Phänomen wird mit einer verringerten Aufnahmefähigkeit dieser Bakterien in kultivierten menschlichen Atemwegs- Epithelien erklärt, in denen ein mutiertes Allel exprimiert wird. CFTR spielt dabei möglicherweise eine direkte Rolle als epithelialer Rezeptor für die Beseitigung dieser Erreger aus den Atemwegen (Pier et al. 1997). Außerdem wird eine indirekte Rolle des CFTR bei solchen Infektionen angenommen: aufgrund der Störung im Elektrolyttransport findet sich bei Mukoviszidose- Patienten eine zu hohe Kochsalzkonzentration in der Atemwegsflüssigkeit, die zu einer Inaktivierung von β -Defensin-1, einem Salz- sensitiven, in den Atemwegs- Epithelzellen exprimierten physiologischen Antibiotikum, führt (Goldman et al., 1997). Vermutlich sind noch viele Details zur Lungenbeteiligung bei Cystischer Fibrose unklar. Sicher ist jedoch, dass das Ausmaß der pulmonalen Symptomatik im wesentlichen die Lebensqualität und Lebenserwartung der Betroffenen bestimmt und der Verlust der Lungenfunktion die häufigste Todesursache der Cystischen Fibrose darstellt.

Ein weiteres häufiges Symptom, das den Respirationstrakt betrifft, stellt das inflammatorisches Ödem der nasalen Mukosa dar. Als Folge davon bilden sich häufig Polypen in der Nase, sie können bei 15% bis 20% der CF- Patienten nachgewiesen werden (Stern et al., 1982). Mit zunehmendem Erreichen höheren Lebensalters nimmt auch die Inzidenz von Nasenpolypen zu, Levine gibt eine Häufigkeit von sogar 48% bei erwachsenen Patienten an (Levine et al., 1987).

1.7.2 Gastrointestinale Symptomatik der Cystischen Fibrose

Im Pankreas führt das visköse Sekret zur Verstopfung der Drüsenausgänge im exokrinen Anteil, dessen Zellen daraufhin degenerieren und fibrosieren. Eine mangelhafte Nahrungsverwertung wird verursacht durch ausbleibende Sekretion von fettabbauenden Enzymen wie Lipase, Trypsin, Amylase und Karboxypeptidase, Folge ist eine erhöhte Ausscheidung nicht hydrolysierter Fette im Stuhl. Bei 85% der Erkrankten wird diese Malabsorption mit teilweise schweren Mangelerscheinungen und Gedeihstörungen beobachtet. Das Fortschreiten der Pankreasfibrose ist zudem häufig mit dem Ausfall der endokrinen Funktion und einem daraus resultierendem Diabetes mellitus, dem Cystic Fibrosis related diabetes, CFRD, verbunden (Hodson, 1992).

Als weiteres gastrointestinales Symptom tritt bei etwa 10%- 20% der betroffenen Neugeborenen ein Mekoniumileus auf, im späteren Lebensalter dann intestinale Störungen in Form eines distalen intestinalen Obstruktionssyndrom oder „Mekoniumileus-Äquivalent“.

1.7.3 Genitale Symptomatik der Cystischen Fibrose

Bei weiblichen CF- Patienten finden sich mässiggradige Einschränkungen der Fertilität, die auf eine unregelmäßige Menstruation und Oligomenorrhoe und einen aus hochviskösem Schleim bestehenden Propf am Zervikalmund des Uterus (Oppenheimer et al., 1970; Kopito et al., 1973) zurückzuführen sind.

Bei den meisten männlichen Betroffenen führt die Mukoviszidose allerdings zu einer totalen Infertilität aufgrund obstruktiver Azoospermie, nur etwa 2% bis 3% der betroffenen Männer weisen eine normale Fertilität auf (Taussig et al., 1972).

Mittels chirurgischer Exploration konnte bereits 1961 bei einem 31-jährigen Mukoviszidose- Erkrankten das beidseitige Fehlen der Samenleiter nachgewiesen werden. Weitere Untersuchungen führten zu analogen Befunden: bei nahezu allen männlichen CF- Patienten ist der Ductus deferens beidseitig entweder gar nicht angelegt oder es liegt nur eine strangartige Struktur ohne Lumen vor (Kaplan et al., 1968; Holsclaw et al., 1971; Stern et al., 1982; Heaton et al., 1990; Wilschanski et al., 1996). Neben der CBAVD konnte auch für einen Teil der Patienten mit einseitiger kongenitaler Samenleiteraplasie (CUAVD) eine Assoziation mit Mutationen im CFTR- Gen hergestellt werden, falls diese nicht mit einer Nierenbeteiligung einhergehen (Mickle et al., 1995). Desweiteren existiert eine obstruktive Azoospermie auch bei beidseitig angelegten Samenleitern, in diesem Fall verursacht durch Verschlüsse der Nebenhodenkörper oder -schwänze (Jarvi et al., 1995; Meschede et al., 1997). Über die Pathogenese der Fehlanlage der Samenleiter besteht noch keine völlige Klarheit: die CFTR- Fehlfunktion könnte während der Embryonalentwicklung des Urogenitaltrakts über einen durch zähflüssige Sekrete bedingten Verschluss des Wolffschen Ganges (Urnierengang) zur Degeneration desselben führen und die Ausbildung der Samenleiter verhindern. Eventuell spielt aber auch das CFTR eine direkte Rolle bei der Entwicklung der Samenleiter.

Tierexperimentelle Studien hierzu wurden zunächst erschwert, da kein natürlich vorkommendes Tiermodell der Mukoviszidose und damit der CF- assoziierten kongenitalen Samenleiteraplasie existiert. Nach Identifizierung des CFTR- Gens wurde daher versucht, transgene Mausmodelle zu schaffen. Die Einschleusung der $\Delta F508$ - Mutation und eines Nukleotid- Austausches im Intron 10 zum Beispiel führt im Maus- Modell zu einer Reduktion der CFTR- mRNA auf 10% in allen Organen (Dorin et al., 1992). Im Mäusemodell macht sich die Mukoviszidose im wesentlichen im Intestinalbereich bemerkbar, pulmonal und genital wird keine oder nur eine geringe Ausprägung von Symptomen festgestellt. Die Erklärung hierfür liefert die Anwesenheit eines alternativen Chloridkanals in den ableitenden Samenwegen, dessen Wirksamkeit nicht durch das CFTR- Gen gesteuert und somit auch nicht durch eine Mutation vermindert wird. Es konnte nachgewiesen werden, dass CF- Mäuse aufgrund dieses Chloridkanals fertil sind, also durchgängige, vollständig angelegte Samenleiter aufweisen (Leung et al., 1996). Hinsichtlich der Pathogenese lässt diese Beobachtung den Schluss zu, dass die Chloridkanäle in jedem Fall eine wichtige Rolle bei der Ausbildung der ableitenden Samenwege spielen. Mit Hilfe dieser tierexperimentellen Modelle konnte somit die Theorie bestätigt werden, das CFTR- Gen und sein Genprodukt mit der Funktion als Chloridkanal stelle den direkten Auslöser für die genitale Symptomatik der Cystischen Fibrose, der CFTR- Gen assoziierten Samenleiteraplasie dar.

Neben den Samenleitern können noch weitere Strukturen des männlichen Genitaltrakts von einer Fehlanlage im Rahmen einer Mukoviszidose beteiligt sein: Nebenhodenkörper und -schwanz sind oft aplastisch oder zumindest hypoplastisch, einzig der Nebenhodenkopf ist angelegt und oftmals deutlich aufgetrieben, des weiteren liegt häufig auch eine Anomalie der Samenbläschen vor. Das gemeinsame, kongenitale Auftreten der genannten Fehlbildungen ist wohl mit der gemeinsamen Entwicklung aus dem Wolff -Gang zu erklären (Young, 1949; Amelar, 1963).

1.8 Die kongenitale Samenleiteraplasie

1.8.1 Die Cystische- Fibrose- assoziierte kongenitale Samenleiteraplasie

Lange Zeit wurde die kongenitale Aplasie des Vas deferens (CAVD) als eigene klinische und genetische Entität angesehen, schon 1950 wurde ein autosomal- rezessiver Erbgang für diese Form männlicher Infertilität postuliert (Nelson et al., 1950). 1971 wurde dann erstmals ein Zusammenhang zwischen der CAVD und einer ungewöhnlich milden Ausprägung der Cystischen Fibrose vermutet, da bei 95% der männlichen CF- Patienten chirurgisch- explorative Untersuchungen einen Verschluss bis hin zum völligen Fehlen der Samenleiter ergaben (Holsclaw et al., 1971). Dieser Zusammenhang wurde insofern bestätigt, als dass einige Patienten mit diagnostizierter Samenleiteraplasie bei genauerer Betrachtung leichte Symptome einer Cystischen Fibrose aufzeigten. Diese Beobachtungen stellten die Grundlage dar für den Vorschlag, die kongenitale Samenleiteraplasie als primär genitale Form der CF zu sehen (Dumur et al., 1990; Anguiano et al, 1992), was es nun auf molekularer Ebene zu untersuchen galt: und tatsächlich konnte gezeigt werden, dass eine Vielzahl der Patienten mit angeborener Samenleiteraplasie Träger der häufigsten, für die Cystische Fibrose verantwortlichen dF508-Mutation im CFTR-Gen sind (Rigot et al., 1991). Außerdem wurde über das häufige Auftreten einer weiteren CFTR- Mutation, und zwar der Klasse 4 R117H-Mutation in ihrer Patientengruppe berichtet (Gervais et al., 1993), was als Beleg für die Hypothese, die CAVD stelle die monosymptomatische, genitale Ausprägung der CF dar, gewertet wurde.

Dabei können sowohl nur einer wie auch beide Samenleiter von der Aplasie betroffen sein, was als unilaterale (CUAVD) beziehungsweise als bilaterale Samenleiteraplasie (CBAVD) bezeichnet wird. Der Grund dafür, warum in einem Fall beide und im anderen Fall nur einer der beiden Samenleiter nicht angelegt sind, besteht wohl darin, dass der Zeitpunkt der durch eben diese Mutationen im CFTR- Gen bedingten Störung in der Entwicklung dieser Strukturen aus dem Wolff- Gang entweder noch vor oder schon nach der Aufteilung des mesonephrischen Gangs in einen rechten und linken Teil stattgefunden hat. Untersuchungen von Mickle et al. zu Folge ist eine Beteiligung des CFTR- Gens bei der Genese der unilateralen Samenleiteraplasie mit durchgängigem kontralateralen Samenleiter unwahrscheinlich. In seiner Studie konnte bei keinem der 12 Patienten, bei denen eben dieser Befund vorlag, eine Mutation im CFTR- Gen

nachgewiesen werden (bei 37 getesteten Mutationen). Weitere neun CUAVD- Patienten mit nicht- iatrogenem Verschuß des kontralateralen, primär, vollständig angelegten Samenleiters hingegen wiesen durchaus Mutationen auf. In acht von neun Fällen (89%) wurde eine Heterozygotie für die Mutationen dF508 (viermal), R117H (zweimal), G551D und N1303K (jeweils einmal) identifiziert (Mickle et al., 1995). Diese sekundäre Obstruktion des eigentlich angelegten Samenleiters bei der CFTR- Gen assoziierten CUAVD scheint ein häufiges Phänomen zu sein. Teilweise kann sie erklärt werden mit einer postentzündlichen Vernarbung bei Zustand nach (meist chronischer) Epididymiditis. Eine Verstopfung des Samenleiters mit zähem Sekret im Sinne des Young-Syndroms erscheint aber noch wahrscheinlicher angesichts der Auswirkung der CFTR- Mutationen auf die Sekretzusammensetzung in jeglichen Organen- eine zu hohe Viskosität der Drüsenabsonderungen gilt ja geradezu als pathognomonisch für die fehlerhafte CFTR- Expression im Gewebe. Natürlich ist es zudem nicht immer einwandfrei zu klären, ob der Samenleiter nun fehlerhaft angelegt ist, nämlich als strangartige Struktur ohne Lumen, oder ob Teile des Duktus deferens sekundär vernarbt und deshalb undurchgängig sind.

Tatsache ist, dass die Klinik der CF- assoziierten CAVD, egal ob uni- oder bilateral, in vielen Fällen die gleiche darstellt. Die ansonsten eigentlich asymptomatischen Patienten werden nach meist mehrjährigem unerfülltem Kinderwunsch wegen Abklärung der Infertilität beim Urologen vorstellig und unter dem Verdacht einer obstruktiven Azoospermie weiterer Diagnostik zugeführt. In vielen Fällen kann dann erst durch die genetische Untersuchung, die im Hinblick auf die Therapie, der künstlichen Befruchtung, durchgeführt wird, mit Nachweis der für die CAVD verantwortlichen Mutationen im CFTR- Gen eine Diagnose gestellt werden. Allerdings kann das Auftreten einer CAVD nicht in allen Fällen mit einer Mutation im CFTR- Gen erklärt werden. Aktuellen Studien zufolge können bei insgesamt 85% der CAVD- Patienten CFTR- Mutationen nachgewiesen werden, davon etwa 56% in compound- heterozygotem und 29% in heterozygotem Zustand, 15% bleiben ohne nachweisbare Mutation (Casals et al., 2000). Attardo et al. konnten bei 56,7% der CAVD- Patienten eine compound- Heterozygotie, bei 35,6% eine Heterozygotie und lediglich bei 7,5% keine Mutation im CFTR- Gen finden (Attardo et al., 2001).

1.8.2 Die kongenitale Samenleiteraplasie mit Nierenbeteiligung

Offensichtlich existiert noch eine bislang meist als von Mutationen im CFTR- Gen unabhängig betrachtete zweite Form der angeborenen Samenleiteraplasie, die mit weiteren urogenitalen Fehlbildungen, charakteristischerweise mit einer einseitigen Nierenfehlanlage einhergeht, und deren Häufigkeit mit etwa 10% bis 21% aller CAVD-Fälle angegeben wird (Schlegel et al., 1996). Aufgrund der von der primär genitalen Form der Cystischen Fibrose abweichenden Genese wird diese Form der CAVD als eigene Entität betrachtet (Augarten et al., 1994; Casals et al., 1995; Schlegel et al., 1996) und bei gleichzeitigem Auftreten einer einseitigen Nierenaplasie/ Nierenagenesie als „CAVD mit Nierenbeteiligung“ bezeichnet. Zum Verständnis der Pathogenese dieser Variante der angeborenen Samenleiteraplasie muss man Vorgänge in der embryologischen Entwicklung der urogenitalen Strukturen als Erklärung heranziehen: der mesonephrische Gang (Urnierengang oder Wolff- Gang) stellt den Vorläufer dar für die distalen zwei Drittel des Nebenhodens (Nebenhodenkörper und -schwanz), für den gesamten Samenleiter, die Samenbläschen, den Duktus ejakulatorius, den Ureter und das intrarenale Sammelsystem. Der Wolff- Gang lässt sich aufteilen in drei verschiedene Regionen, und zwar in den oberen mesonephrischen Gang (upper mesonephric duct, UMD), in den proximalen Samenleiter- Vorläufer (proximal vas precursor, PVP) und in den gemeinsamen mesonephrischen Gang (common mesonephric duct, CMD). Sobald nun zwischen der vierten und sechsten Schwangerschaftswoche der CMD in den Urogenitalsinus, die spätere Harnblase übergeht, steigt die Ureterknospe auf, und zwar ausgehend von dem kranialen, orthotopen oder kaudalen Teil des CMD. Tritt nachfolgend der PVP mit dem Urogenitalsinus in Kontakt, erfolgt eine räumliche Trennung zwischen dem PVP und dem CMD. Ersterer bleibt nämlich ohne weitere Wanderung in Richtung kranial in seiner Position, um den Duktus ejakulatorius, die Samenbläschen und den juxtaurethralen Anteil des Samenleiters auszubilden. Der UMD stellt die Grundlage dar für den distalen Anteil des Samenleiters sowie die distalen zwei Drittel des Nebenhodens. Der Nebenhodenkopf jedoch entsteht aus den Überresten des degenerierenden Mesonephros (Urnier), einem System von primitiven Tubuli-Vorläufern, die sich ausgehend von der Ampulle des frühen mesonephrischen Gangs zu entwickeln beginnen. Tritt nun eine einseitige fehlerhafte Ausbildung der Samenleiter,

Samenbläschen und Nebenhoden gemeinsam mit einer Fehlentwicklung der Niere auf, so deutet dies auf eine Entwicklungsstörung des gesamten diesseitigen mesonephrischen Ganges, also CMD, PVP und UMD hin. Zudem spricht diese Konstellation für einen Zeitpunkt der Störung, der vor der sechsten bis siebten Schwangerschaftswoche liegt. Zu diesem Zeitpunkt nämlich erfolgt die endgültige Trennung des Wolff-Gangs von der Ureterknospe. Mit Hilfe dieser schon 1978 formulierten und später wieder aufgegriffenen embryologischen Erklärung scheint die Genese der unilateralen Samenleiteraplasie samt ipsilateraler Nierenbeteiligung geklärt (Gibbons et al., 1978; Mickle et al., 1995).

Allerdings bereitet es auch heute noch Schwierigkeiten, allen bisher klinisch beobachteten Varianten der Samenleiteraplasie mit Nierenbeteiligung hinsichtlich ihrer Entstehung Rechnung zu tragen. Sowohl uni- wie auch bilaterale Samenleiterfehlanlagen mit ipsi- oder seltener auch kontralateraler Nierenbeteiligung existieren, wobei keinesfalls jeweils bis ins Detail geklärt werden kann, welcher Mechanismus im einzelnen für die Fehlbildung verantwortlich ist.

Ein Blick auf die Entwicklung des nephrogenen Systems, welche zeitlich abgestuft in drei funktionell unterschiedlich differenzierten Einheiten erfolgt, kann womöglich in dieser Hinsicht mehr Klarheit verschaffen. Die erste Entwicklungsstufe stellt die Vorniere, das Pronephros, dar, welches mit Ablauf der vierten Embryonalwoche vollständig verschwunden ist und der zweiten Stufe, der Urnieren oder Mesonephros weicht. Diese Entwicklungsstufe erfüllt von der vierten bis zur achten Woche die Nierenfunktion. Am Ende der achten Woche löst sich der überwiegende Teil des Mesonephros auf- hieraus wird der Nebenhodenkopf gebildet- wobei sich Anteile des Gangsystems mit den männlichen Fortpflanzungsorganen verbinden. Nun beginnt die Entwicklung der Nachnieren oder Metanephros mit der Ausstülpung der Ureterknospe aus dem mesonephrogenen Gang, der dem Ausführungsgang der Vor- und Urnieren in die Kloake entspricht. Eine ausbleibende Entwicklung oder Ektopie dieser Ureterknospe ist in der Ontogenese verantwortlich für angeborene Anomalien der Niere und des Urogenitaltrakts (Kuwayama et al., 2002). Das vollständige Fehlen der Nierenanlage, die Nierenagenesie jedoch ist mit einer Inzidenz von 1:1000 bis 1:1500 relativ häufig. Dabei fehlt laut Statistik die linke Niere etwas häufiger als die rechte, zudem sind Männer etwa doppelt so häufig betroffen wie Frauen. Auf der betroffenen Seite fehlen neben der Niere

auch der Harnleiter, die Hälfte des Blasentrigonums, der Ductus deferens und der ipsilaterale Prostatalappen, im Falle einer kongenitalen unilateralen Samenleiteraplasie mit ipsilateraler Nierenagenesie also eine ausreichende Erklärung für deren gemeinsames Auftreten. Die Häufigkeit einer Kombination von CUAVD und Nierenagenesie wird mit 26% (Schlegel et al., 1996), 33% (Kolettis et al., 2002), 38% (Mickle et al., 1995) bis zu 73,7% (Weiske et al., 2000) angegeben. Problematisch erscheint jedoch eine Unterscheidung zwischen einer Nierenagenesie und der Nierenaplasie, wenn bei der sonographischen Untersuchung eines CAVD- Patienten keine Niere oder Nierenanlage dargestellt werden kann. Im Gegensatz zur Nierenagenesie setzt die Nierenaplasie voraus, dass Teile des metanephrogenen Blastems vorhanden sind, eine Entwicklung der Niere jedoch nicht vollständig erfolgte. Aplastisches Gewebe entspricht undifferenziertem Blastem, das später eventuell als verkalktes Gewebe in der Röntgenleeraufnahme dargestellt werden kann, funktionell jedoch keinerlei Bedeutung hat. Der Harnleiter ist meist in atretischer Form nachweisbar, und auch Anomalitäten des Genitaltrakts werden in diesen Fällen beschrieben, wobei nicht mit Regelmäßigkeit von einem Fehlen der Abkömmlinge des Wolff- Gangs auszugehen ist. Untersuchungen von Hiraoka zufolge stellt die Nierenaplasie die überwiegende Ursache für angeborene Einzelnieren dar. Eine Nierenagenesie wurde in seiner Studie definiert als fehlendes renales Parenchym sowie fehlende Funktion im Szintigramm, eine Nierenaplasie als zwar vorhandenes Nierenparenchym bei fehlender Funktion. Seine Ergebnisse stellen die bisher vertretene Meinung, Einzelnieren wären hauptsächlich Folge einer Nierenagenesie, in Frage. Bei einem Neugeborenen-Screening zum Nachweis von Nierenfehlbildungen mittels Ultraschall konnte nämlich in drei Fällen eine schrittweise Rückbildung von kleinen, funktionslosen Nieren bei der Geburt bis zu kaum noch identifizierbarem parenchymalem Gewebe in einem Alter von einem Jahr verfolgt werden, was mit der Diagnose der Nierenaplasie in Einklang gebracht werden konnte. Da das Kollektiv 4000 Neugeborene umfasste, darf von einer Inzidenz von 1:1300 für eine Nierenaplasie ausgegangen werden, wohingegen kein einziger Fall von Nierenagenesie nachweisbar war. In Hinblick auf die durchaus bestehenden Schwierigkeiten einer eindeutigen Differenzierung der Nierenabnormitäten lässt Hiraoka daher die Schlussfolgerung zu, dass ein Großteil der klinisch diagnostizierten Einzelnieren wohl auf eine Nierenaplasie, und nicht, wie ursprünglich angenommen, auf

eine Nierenagenesie zurückzuführen ist (Hiraoka et al., 2002). Demnach ist die Inzidenz einer Nierenagenesie vermutlich weitaus geringer einzuschätzen als die oben angegebenen 1:1000 bis 1:1500, ebenso wie die Wahrscheinlichkeit, dass sich eine CAVD bei Patienten mit Einzelniere einzig als entwicklungsgeschichtlich direkte Folge einer Nierenagenesie erklären lässt. Es muss also noch andere Grundlagen für das gemeinsame Auftreten von angeborener Samenleiteraplasie und Nierenfehlanlagen geben. Forderungen nach einem eigenen Erbgang, sei er X- chromosomal oder autosomal rezessiv, oder auch autosomal- dominant mit variierender Penetranz, bestehen durchaus, konnten jedoch in bisherigen wissenschaftlichen Studien nicht begründet werden, sondern stützen sich vielmehr auf Vermutungen und Spekulationen. Insgesamt gesehen unterstreichen die oben genannten, zwar noch nicht bis ins Detail erforschten Zusammenhänge zwischen der angeborenen Samenleiteraplasie und einer Nierenfehlanlage die schon früher formulierte Forderung nach einer eigenen, von CFTR- Mutationen unabhängigen klinischen Entität. In keinem der CAVD- Fälle mit Nierenbeteiligung konnten lange Zeit Mutationen im CFTR- Gen nachgewiesen werden (Rubin et al., 1975; Augarten et al., 1994; Oates et al., 1994; Dumur et al., 1996, Schlegel et al., 1996; Stuhmann et al., 1998; Taille et al., 1998). Einzig eine im Jahr 2000 veröffentlichte Studie von Casals beschreibt das Vorkommen von Mutationen im CFTR- Gen, die nach extensiver Analyse bei fünf von 16 Patienten mit CAVD und einseitiger Nierenfehlanlage nachgewiesen werden konnten. Bei den beiden CBAVD- Patienten lag neben einer einseitigen Nierenaplasie in einem Fall eine Heterozygotie für die 5T- Variante im Intron 8 vor, im anderen Fall wurde eine als L997F bezeichnete, äußerst seltene Mutation ebenfalls im heterozygoten Zustand nachgewiesen. Von den drei CUAVD- Betroffenen mit Nierenbeteiligung wies ein Patient ebenfalls eine Heterozygotie für die relativ häufige Spleißvariante IVS8- 5T auf (die Frequenz in der Bevölkerung wird mit etwa 5% angegeben), in den anderen beiden Fällen lag einmal die weltweit häufigste $\Delta F508$ Mutation und einmal die 3732delA Mutation im heterozygoten Zustand vor. In wie weit diese Studie nun der gängigen Meinung widerspricht, eine Mutation im CFTR- Gen sei nicht zu erwarten bei einer gleichzeitigen einseitigen Nierenfehlanlage, oder es sich bei den detektierten Mutationen um, mit der CAVD in keinem ursächlichen Zusammenhang stehende, zufällige Befunde handelt, die bei einer Heterozygotenfrequenz von 1:25 eventuell auftreten können, steht zur Diskussion.

Zudem könnten auch die einseitige Nierenaplasie, die mit einer Frequenz von 1: 1300 in der Bevölkerung auftritt, zufällig mit einer mit Mutationen im CFTR- Gen assoziierten CAVD einhergehen. Casals selbst schreibt diese Diskrepanz zwischen den vorausgegangenen Studien und ihren eigenen überraschenden Ergebnissen dem bislang zu geringen Spektrum an getesteten CFTR- Mutationen zu. In ihrer Studie wurde nämlich neben der Suche nach den häufigsten, im üblichen Routineprogramm miteinbezogenen Mutationen eine erweiterte Analyse des gesamten CFTR- Gens durchgeführt (Casals et al., 2000). Die Frage nach dem Zusammenhang der CAVD mit Nierenbeteiligung und Mutationen im CFTR- Gen sollte somit in jedem Fall neu diskutiert werden.

Die Heterogenität der angeborenen Samenleiteraplasie stellt durchaus eine Herausforderung dar für den Untersucher dieses Krankheitsbilds samt dessen Ursachen, denn auch nach Berücksichtigung dieser CAVD- Form mit Nierenbeteiligung bleibt eine Gruppe von CAVD- Patienten bestehen, bei der weder Mutationen im CFTR- Gens noch eine Nierenfehlanlage nachgewiesen werden können, die Aufklärung der Ätiologie dieser Form der CAVD bleibt wohl vorerst Aufgabe weitere Studien.

2. Material und Methoden

2.1 Patientenkollektiv

Aufgabe dieser Arbeit war es, Zusammenhänge zwischen Mutationen im CFTR- Gen und dem Auftreten einer kongenitalen Samenleiteraplasie unter besonderer Berücksichtigung einer Nierenbeteiligung zu untersuchen. Dafür stand uns ein Kollektiv von 64 männlichen Patienten zur Verfügung, die allesamt wegen seit mehr als zwei

Jahren bestehenden unerfülltem Kinderwunsch die urologische Praxis von Prof. Schwarzer, Freising aufsuchten. Retrospektiv wurden Daten aus den Krankenakten ausgewertet, ausreichend für eine Beteiligung an unserer Studie waren die Informationen von 62 der 64 Patienten.

Das Alter der Patienten zum Zeitpunkt des Aufnahmedatums reichte von 25 bis 49 Jahre, erste Aufnahme eines Patienten mit der Verdachtsdiagnose der angeborenen Samenleiteraplasie war im Februar 1994, die letzte, die mit in die Untersuchungen einbezogen wurde, fand im August 2002 statt. Was die Herkunft betrifft, war der Großteil der Patienten, insgesamt 50, deutschen Ursprungs (80.6%), vier waren italienischer (6.5%), drei türkischer (4.8%), zwei englischer (3.2%) und je ein Patient japanischer, afghanischer und tunesischer Herkunft (je 1.6%).

2.2 Anamnese und körperliche Untersuchung

Die Anamnese war in allen Fällen ähnlich: aufgrund seit mehr als zwei Jahren bestehendem unerfüllten Kinderwunsches sollte nun die Abklärung der Fertilität des Ehemanns erfolgen, nachdem die gynäkologische Untersuchung der Partnerin meistens

bereits durchgeführt und dabei keine hinreichende Ursachen für die anhaltende Kinderlosigkeit gefunden worden war. Vereinzelt wurden Vorerkrankungen genannt, die nicht im Zusammenhang mit der vermuteten Infertilität zu sehen sind, wie zum Beispiel eine Klippel- Feil- Anomalie im Bereich der Halswirbelsäule (Patient 56) oder ein Morbus Recklinghausen (Patient 10). Andererseits wurden in der Krankengeschichte auch gelegentlich rezidivierende Atemwegsinfekte (Patient 20, 62), chronische Bronchitiden (Patient 38, 45), Asthma bronchiale (Patient 1) und chronische Pankreatitiden (Patient 6) verzeichnet. Bei vier Patienten (13, 15, 17, 43) war eine manifeste Mukoviszidose bereits bekannt, jedoch nur in einer milden Ausprägung, die bis zum Zeitpunkt der Aufnahme ohne ernsthafte gesundheitliche Probleme einhergegangen war. Zwei der Mukoviszidose- Patienten waren Brüder (Patient 12, 16), der jüngere von beiden verstarb in der Zwischenzeit (Patient 12). An urologischen Vorerkrankungen wurde von

einer chronischen Epididymitis berichtet (Patient 4), an chirurgischen Eingriffen wurden in der Vorgeschichte ein- und beidseitige Herniotomien bei kongenitalen Leistenbrüchen (Patient 7, 31, 33, 62) sowie Orchidopexien bei Maldescensus testis (Patient 23, 26, 51) und Hodentorsion (Patient 37, 44, 61) durchgeführt.

Neben der Erhebung der Eigenanamnese des von der obstruktiven Azoospermie betroffenen Patienten wurde auch, soweit möglich, eine Familienanamnese erhoben. Hinsichtlich der Fertilität eventuell vorhandener Brüder wurden die Betroffenen befragt, aber auch nach Fällen von manifesten Mukoviszidose- Erkrankungen in der Familie. Außer der Tatsache dass sich, zeitlich versetzt, zwei Brüder (Patient 12 und 16) in Behandlung befanden verlief die familienanamnestische Befragung allerdings völlig ergebnislos.

Zudem wurde nach urologischen Fehlanlagen, insbesondere einer Nierenagenesie oder Nierenaplasie innerhalb der Familie des Patienten gefahndet. Es wurden jedoch auch hier keinerlei familiären Besonderheiten vermerkt, wobei gerade bei Fragen nach dem Auftreten von Nierenfehlbildungen in der Familie oftmals aus Unwissenheit keine genauen Aussagen gemacht werden konnten und die Familienanamnese somit leider große Lücken aufweist.

Insbesondere diejenigen Patienten, bei denen neben der Samenleiteraplasie noch sonographisch eine Nierenbeteiligung nachgewiesen wurde, sollten nochmals eindringlich familienanamnestisch befragt werden, was sich erstaunlicherweise als sehr problematisch erwies. Patient 7 konnte immerhin angeben, dass seine Mutter, seine Schwester, deren Sohn und Tochter, sowie die eigene Tochter zwei orthotop gelegene Nieren besitzen. Zwei Cousins konnten auf natürlichem Wege Nachwuchs erlangen und gelten somit als fertil. Der Vater des Betroffenen verstarb bereits, eine Aussage zum Nierenbefund war nicht möglich. Außerdem berichtete der Patient von seiner bei der Geburt verstorbenen Zwillingschwester, deren Nierenstatus ebenso unbekannt bleibt. Patient 9 gab an, sowohl seine Eltern als auch sein Bruder hätten nachgewiesenermaßen beidseits angelegte Nieren. Zudem ist der Bruder Vater dreier Kinder, allerdings liegen für diese keine Ultraschallbefunde vor, weshalb keine Aussage zur Nierenanlage getroffen werden kann. Bei Patient 23 konnte außer der Tatsache, dass beide Brüder des Betroffenen fertil sind, keine Aussage zur Familienanamnese gemacht werden, da Fragen zum Nierenstatus näherer Verwandten nicht beantwortet

werden konnten. Die eigenen Kinder (Zwillinge, ein Junge und ein Mädchen) haben beidseits orthotop gelegene Nieren. Patient 26 konnte nur Angaben zu seinen eigenen Kindern machen: bei beiden Zwillingen sind Nieren beidseits angelegt, der Junge hat jedoch aufgrund einer Harnklappenverengung links eine funktionslose Schrumpfniere, die mittlerweile entfernt wurde. Patient 35 war aufgrund eines Wohnortwechsels weder über seinen damaligen Arbeitsplatz, die Telefonauskunft, den damals behandelnden Hausarzt, noch die an der Behandlung beteiligten Fachärzte und Klinik auffindbar. Die Auswertung der Akten aus der Frauenklinik Dr. Krüsmann, in der fünfmalig eine intrazytoplasmatische Spermieninjektion durchgeführt wurde ergaben, dass die Befruchtungsversuche allesamt gescheitert waren. Möglicherweise steht dies im Zusammenhang mit dem Abbruch jeglichen Kontakts zu den damals behandelnden Ärzten. Leider wurde zu dem Zeitpunkt, als sich der Patient noch in Behandlung befand, keine Familienanamnese erhoben, eine nachträgliche Befragung des Patienten war nun ebenfalls nicht mehr möglich. Patient 48 gab an, ein sonographischer Nachweis über die orthotope Lage beider Nieren bestünde lediglich von seinen eigenen Kindern, Zwillingen, als auch von den beiden Töchtern seiner Halbschwester, über die Nierenanlage weiterer Verwandten sei ihm nichts bekannt. Aufgrund eines Umzugs ins Ausland entzog sich Patient 51 weiterer Befragungen zur Familienanamnese. So konnten wir auch in diesem Falle nur auf die zum Zeitpunkt der Behandlung erfolgte Familienanamnese zurückgreifen: sowohl die Eltern des Betroffenen als auch dessen Bruder haben nachgewiesenermaßen beidseits angelegte Nieren, der Bruder ist zudem Vater dreier Kinder, die jedoch noch nicht sonographisch untersucht wurden. Patient 55 berichtete, seine Eltern, seine Schwester und deren Kinder, ein Junge und ein Mädchen, hätten allesamt beidseits orthotop gelegene Nieren. Ebenso seine drei Brüder, die jeweils Väter sind von drei, zwei beziehungsweise einer Tochter, die alle ebenfalls beidseitige Nierenanlagen aufweisen sollen. Ob diese Befunde allerdings wirklich sonographisch bestätigt sind, bleibt offen, da wir uns auf die Angaben des Patienten verlassen müssen. Zum klinischen Befund: das äußere Erscheinungsbild aller Patienten war insgesamt unauffällig und von androgenem Behaarungstyp. Die Tastuntersuchung der Leistenregion führte bei 53 der insgesamt 62 (inklusive der vier Mukoviszidose-Patienten zur Verdachtsdiagnose der beidseitigen Samenleiteraplasie im Sinne einer CBAVD. Die restlichen neun Patienten (4, 7, 9, 26, 35, 37, 41, 49, 51) wiesen eine

einseitige Fehlanlage der Samenleiter auf, drei davon rechtsseitig (Patient 4,7,26), die anderen sechs linksseitig, während auf der gegenüberliegenden Seite jeweils zumindest eine strangartige Struktur tastbar war.

CUAVD links	Patient 9, 35, 37, 41, 49, 51
CUAVD rechts	Patient 4, 7, 26
CBAVD	Patient 1, 2, 3, 5, 6, 8, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 24, 25, 27, 28, 29, 30, 31,32 ,33, 34 , 36, 38, 39, 40, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 50, 52, 53, 54, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62

Durch Inspektion und Palpation der Hoden wurde in vier Fällen eine Varikozele (Patient 11, 25, 38, 52), in zwei Fällen eine Spermatozele (Patient 3, 6), in einem Fall eine Hydrozele (Patient 5) diagnostiziert. In zwei Fällen war ein Hoden atrophiert, aber orthotop gelegen (Patient 24, 36), in einem Fall wurde ein atrophierter Leistenhoden vermutet und durch radiologische Bildgebung (Computertomographie) bestätigt.

Durch rektal- digitale Untersuchung wurde in allen Fällen eine unauffällige Prostata palpirt, die Samenbläschen ließen sich hierbei nur unzureichend beurteilen.

2.3 Bildgebende Diagnostik

Im nächsten Untersuchungsschritt folgte die transrektale Ultrasonographie mittels eines Sektor- Schallkopfes der Frequenz 7,5 MHz. Die bildliche Darstellung der Prostata war in allen Fällen unauffällig, die Samenbläschen jedoch oft abnorm oder nicht angelegt, was durchaus zu erwarten war, da die angeborene Samenleiteraplasie regelmässig

zusammen mit weiteren Abnormitäten urogenitaler, dem Wolff- Gang entspringenden Strukturen in Erscheinung tritt.

Die Sonographie des Abdomens mit einem 3.5 MHz Schallkopf ist insbesondere zur Beurteilung von Lage, Form und Größe der Nieren von wichtiger Bedeutung. Wie oben erläutert wird hinsichtlich der Ätiologie zwischen verschiedenen Formen der angeborenen Samenleiteraplasie unterschieden. Dabei spielt die einseitige Nierenaplasie eine sehr wichtige Rolle: so galt langezeit die Wahrscheinlichkeit des Auftretens von Mutationen im CFTR- Gen bei Patienten mit CAVD mit Nierenbeteiligung gegenüber der Allgemeinbevölkerung als nicht erhöht, wie in mehreren Publikationen nachgewiesen wurde. Im Gegensatz zu der CAVD- Form, die mit Mutationen im CFTR- Gen einhergeht und deshalb als primär genitale Form der Mukoviszidose betrachtet wird, schien die Ätiologie der Samenleiteraplasie bei Patienten mit Nierenbeteiligung eine von Mutationen im CFTR- Gen unabhängige zu sein (Augarten et al., 1994; Dumur et al., 1996; Schlegel, 1996). Allerdings lässt sich diese bislang geltende Forderung nach genetischer Unabhängigkeit zwischen der CF- assoziierten CAVD und der Form mit Nierenbeteiligung aufgrund neuerer Studien nun nicht mehr mit Sicherheit aufrechterhalten, da derzeit fünf Fälle mit gleichzeitigem Auftreten von CFTR- Mutationen sowie einseitiger Nierenaplasien beschrieben werden (Casals et al., 2000). Bei unserem Patientenkollektiv wurden die Nieren auf ihre orthotope Lage, Form und Größe hin untersucht: bei 46 Patienten (74,2%) konnte der Nachweis zweier orthotop gelegenen, hinsichtlich Größe und Form im Normbereich liegenden Nieren mit Ultraschallbildern erbracht werden. Bei insgesamt acht Patienten (12,9%) wurde eine einseitige Nierenagenesie oder Nierenaplasie festgestellt (eine Differenzierung zwischen diesen beiden Formen von Fehlbildungen ist mittels Ultraschall nicht möglich) (Patient 7, 9, 23, 26, 35, 48, 51, 55), in einem Fall lag kontralateral zudem eine Beckenniere vor (Patient 55). In einem weiteren Fall wurde neben einer orthotop gelegenen Niere eine Beckenniere diagnostiziert (Patient 44), wohingegen bei den restlichen sieben Patienten (11,3%) zwar keine Auffälligkeit hinsichtlich der Nieren beschrieben waren, sich jedoch auch keine beweisenden Sonographie- Ausdrücke in den Akten befanden, so dass die Frage nach Lage und Ausprägung der Nieren in diesen Fällen unbeantwortet bleiben muss.

	CUAVD	CBAVD
Patienten mit Nierenbeteiligung	7, 9, 26, 35, 51	23, 48, 55

2.4 Histologische Untersuchung

Neben der klinischen Untersuchung wurde nun ein auswärts erstelltes Spermogramm zur weiteren diagnostischen Einschätzung der Fertilität der Patienten herangezogen und nach WHO- Kriterien beurteilt. Es erfolgten zwei Untersuchungen innerhalb von zwei Wochen, beide nach 3- bis 4-tägiger Sexualkarenz, wobei die mikroskopische Ejakulatuntersuchung die klassischen Spermogramm- Parameter wie Spermienzahl, Spermienbeweglichkeit und Morphologie erfasst: In keinem der Fälle jedoch konnten Spermienformen nachgewiesen werden, was die Diagnose der Azoospermie forderte. Gerade bei den Patienten mit palpatorisch beidseitigem Fehlen der Samenleiter passte dieser histologische Befund gut zum Ergebnis der körperlichen Untersuchung.

Das Nicht- Vorhandensein von Spermien im Ejakulat der Patienten, deren körperliche Untersuchung das Bild einer einseitigen Samenleiteraplasie bot, erschien verwunderlich. Das genauere Betrachten der Anamnese dieser Patienten lieferte jedoch in vier Fällen eine hinreichende Erklärung für die Undurchgängigkeit der primär angelegten Samenleiter: in einem Fall von CUAVD gingen wohl chronische Epididymitiden der Gegenseite einer Vernarbung und somit sekundären Obstruktion voraus (Patient 4). In zwei weiteren Fällen ist die Ursache des sekundären Verschluss eventuell iatrogenen Ursprungs: eine einseitige Leistenhernie wurde im Säuglingsalter chirurgisch reponiert und fixiert, und eben der diesseitige, eigentlich vollständig angelegte Samenleiter ist nun nicht mehr passabel, was die Vermutung nahe legt, er wurde bei dem Eingriff verletzt und vernarbte als Folge davon (linksseitig bei Patient 7, rechtsseitig bei Patient 51). Auch eine Orchidopexie bei Maldescensus testis könnte als Erklärung für die sekundäre Obstruktion nach Verletzung und Vernarbung des gleichseitigen Samenleiters

dienen (Patient 26). In den restlichen drei Fällen blieb die Ursache der Azoospermie trotz eines primär angelegten Samenleiters ungeklärt. Zum eventuellen Nachweis eines sekundären zentralen Verschlusses im Sinne des Young- Syndroms oder anderen obstruierenden Veränderungen blieb die chirurgische Exploration abzuwarten.

Die histologische Untersuchung des Ejakulats lieferte bei keinem unserer Patienten ein Ergebnis hinsichtlich der Spermatogenese, da in allen Fällen eine absolute Azoospermie vorlag. Somit konnten keinerlei Aussagen darüber gemacht werden, ob eine physiologische Ausreifung von Spermienformen erfolgt und damit auch keine Voraussage darüber getroffen werden, ob eine künstliche Befruchtung mit mikrochirurgisch gewonnenen Spermatozoen aus Nebenhoden und Hoden möglich ist. Kaplan ging 1968 von einer reduzierten Spermatogenese aus (Kaplan et al., 1968), was später von Gottlieb widerlegt werden konnte (Gottlieb et al., 1991). Auch weitere Untersuchungen beschreiben eine von Spermatozoen im Ejakulat nicht zu unterscheidende morphologische Ultrastruktur der aus Rete testis, Vasa efferentia und Nebenhodenkopf aspirierten Spermien (Asch et al., 1992). Ein gegenüber der Normalbevölkerung erhöhtes Vorkommen von CFTR- Mutationen bei Patienten mit reduzierter Spermienqualität wurde jedoch festgestellt, und daraus der Schluss gezogen, Mutationen im CFTR- Gen seien neben der CAVD auch für weitere Ursachen der Infertilität, wie beispielsweise eine reduzierte Spermienqualität verantwortlich. Es wird seither vermutet, das CFTR- Protein könnte beteiligt sein am Prozess der Spermatogenese oder Spermienreifung, unabhängig von seiner Funktion in der Entwicklung von Samenbläschen und Samenleitern (van der Ven, 1996). Auch tierexperimentelle Untersuchungen an Hodengewebe von Ratten lieferten Hinweise auf einen direkten Zusammenhang zwischen dem CFTR- Protein und der Entwicklung und Reifung der Spermien. Dort konnte nämlich, beschränkt auf die postmeiotischen runden Spermatozoenformen, CFTR- mRNA nachgewiesen werden. Während dieses Entwicklungsstadiums reifen haploide Spermatozoen durch eine Reihe morphogenetischer Veränderungen einschließlich Kernkondensation und drastischen Zellplasma-Schrumpfungen, verursacht durch eine Verringerung des intrazellulären Wassergehalts, zu Spermatozoen heran. Da die maximale CFTR- Expression in den sogenannten Rundzellen unmittelbar diesen Veränderungen vorhergeht, wird eine physiologische Rolle des CFTR- Proteins als Chloridionen- Kanal während der Spermatogenese bei

Ratten angenommen (Trezise et al., 1993). Über ähnliche Experimente an menschlichem Gewebe wurde bislang nichts berichtet, ist die CAVD aber bedingt durch Mutationen im CFTR- Gen, so wird aufgrund von gegenüber einer Kontrollgruppe niedrigeren Fertilisationsraten bei der konventionellen In- vitro- Fertilisation von Defekten in der Penetrationszone oder in der Membranfusions- Kapazität ausgegangen (Silber et al., 1994). Wird aber, wie in unserem Fall, das neuere Verfahren der ICSI zur Therapie kinderloser Paare eingesetzt, so werden vergleichbare Fertilisationsraten bei Patienten obstruktiver Azoospermie unterschiedlicher Genese erzielt. Selbst wenn die oben genannten Defekte oder auch Einschränkungen der Beweglichkeit der Spermien bei CAVD- Patienten mit CFTR- Mutationen tatsächlich in höherem Maße auftreten, kann diese Problematik mittels assistierter Fertilisationstechniken wie der ICSI umgangen werden, da hierbei in vitro ein Spermatozoon direkt in die Eizelle injiziert wird.

Darüber, wie sich eine angeborene Samenleiteraplasie mit Nierenbeteiligung, bei der eine ursächliche Mutation im CFTR- Gen lange als unwahrscheinlich angesehen wurde, auf die Spermatogenese auswirkt und ob in diesem Fall mit Einschränkungen oder Defekten der Spermienmorphologie zu rechnen ist, liegen bislang keine Untersuchungen vor. Die mit dieser Form der angeborenen Samenleiterfehlanlage einhergehenden weiteren urogenitalen Fehlbildungen wie das Fehlen der Samenbläschen oder eine Aplasie von Nebenhodenkörper und -schwanz könnten aber durchaus für eine Herabsetzung der Spermienqualität verantwortlich sein. Tatsache ist, dass es für nachfolgend therapeutische Maßnahmen von großer Wichtigkeit ist, ob bei den Patienten mit obstruktiver Azoospermie von einer ausreifenden Spermatogenese ausgegangen werden kann, was meist dann der Fall ist, wenn der Hormonstatus Normalwerte aufweist. Deshalb erfolgte bei unseren Patienten im nächsten Schritt der Diagnostik die Erhebung des Hormonstatus.

2.5 Hormonstatus

Fertilitätsstörungen des Mannes können Folge einer Fehlsteuerung der Hypothalamus - Hypophysen- Gonaden- Achse sein. Die durch den Hypothalamus bewirkte pulsatile

Freisetzung von Gonadotropin- Releasing- Hormon (GnRH) in einem Rhythmus von acht Impulsen pro Tag unterhält die fortlaufende Sekretion von luteinisierendem Hormon (LH) und follikelstimulierendem Hormon (FSH) durch die Hypophyse. LH stimuliert die Testosteronsynthese und -sekretion in den Leydig- Zwischenzellen. Ein Teil des Testosterons wird in der Peripherie zu Östradiol umgewandelt, welches über ein negatives Feedback die LH- Sekretion steuert. Die testikulären Sertolizellen setzen Inhibin frei und regulieren damit die Freisetzung von FSH, weshalb es bei Schädigung der Sertolizellen zu einem Anstieg von FSH kommt. Ebenso spielt Prolaktin bei Störungen der männlichen Reproduktionsfähigkeit eine Rolle, da es eigentlich der inhibitorischen Steuerung durch den Hypothalamus unterliegt. Um festzustellen, ob eine hormonelle Fehlregulation bei unseren Patienten vorliegt, wurde der FSH und der LH- Serumspiegel bestimmt. So sollte ein primärer, hypergonadotroper Hypogonadismus sowie ein sekundärer hypogonadotroper Hypogonadismus ausgeschlossen werden, der eine Störung der Spermatogenese im Sinne einer primären Hodeninsuffizienz erklären würde. Dabei wiesen 52 Patienten (83,9%) einen Serumspiegel der beiden untersuchten hypophysären Hormone im Normbereich auf, nur in einem Fall war der FSH- Wert leicht erhöht (Patient 4), in einem anderen Fall der LH- Wert erniedrigt (Patient 5). Bei den restlichen acht Patienten (12,9%) wurde das Ergebnis der Untersuchung des Hormonstatus nicht in der mir zur Verfügung stehenden Krankenakte vermerkt.

Bei der Bestimmung des Testosteronspiegels wurde in neun Fällen (14,5%) ein zu niedriger Serumwert an gebundenem Testosteron gemessen gegenüber 21 Fällen (33,9%) mit normal hohem Testosteron, von den restlichen 32 Patienten fehlt der Befund, freies Testosteron war in drei untersuchten Patientenseren erniedrigt. Ein zu niedriger Testosteronspiegel kann auf eine inkretorische Hodeninsuffizienz hinweisen, bei der die Leydig- Zellen unzureichend Testosteron produzieren und die faktisch immer mit einer tubulären Hodeninsuffizienz, also mit einer Störung der spermatogenetischen Funktion einhergeht .

Ingesamt gab der von unserem Patientengut erhobene Hormonstatus keinen Anlass für die Befundung schwerer hormoneller Störungen mit der Folge einer gestörten Spermatogenese. Ein solches Ergebnis war besonders für das weitere Vorgehen in der Behandlung des infertilen Patienten von wichtigem Interesse. Ein Hormonspiegel im Normbereich lässt eine ausreifende Spermatogenese vermuten, somit besteht die

Therapiemöglichkeit einer künstlichen Befruchtung nach mikrochirurgischer Entnahme epididymaler oder testikulärer Spermatozoen.

2.6 Genetische Untersuchung

Die genetische Analyse als Einschlusskriterium für die Therapiemöglichkeit der mikrochirurgischen Spermengewinnung mit anschließender künstlicher Befruchtung forderte 1996 die Sektion Mikrochirurgie der deutschen Gesellschaft für Urologie aus forensischen Gründen, daher erfolgte die genetische Untersuchung samt ausführlicher Beratung unserer Patienten wie auch deren Partnerinnen. Aufgrund des Zusammenhangs zwischen der Verdachtsdiagnose unserer 62 Patienten, der angeborenen Samenleiteraplasie und dem gehäuften Vorkommen von Mutationen im CFTR- Gen war diese Genotypanalyse unserer Patienten samt ihrer Partnerinnen von wichtiger Bedeutung für die Ermittlung des Vererbungsrisikos eines defekten Gens mit der möglichen Folge einer Erkrankung des Nachwuchses, im schlimmsten Falle der Erkrankung an einer manifesten Mukoviszidose. Für diese Untersuchung suchten die Patienten verschiedene Humangenetische Institute auf, meist in räumlicher Nähe zum Wohnort, die den genetischen Befund sowohl des Betroffenen als auch dessen Ehefrau erstellten.

Die DNA- Isolierung aus EDTA- Blut zur direkten Genotyp- Analyse erfolgte nach Standardprotokollen mittels Phenol- Chloroform- Extraktion oder mittels einer Aussalzmethode (Miller et al., 1988). Im ersten Schritt amplifizierte man nun die DNA in einer Polymerasekettenreaktion (PCR) mit Hilfe definierter Oligonukleotid- Primer, um die definierten Ziel- DNA- Sequenzen schnell zu vervielfältigen. Bei dieser Kettenreaktion dienen die neu synthetisierten DNA- Stränge in den folgenden Zyklen als Matrizen für die weitere DNA- Synthese. In etwa 30 Zyklen werden bei der PCR zusätzlich zur Ausgangs- DNA etwa 10^5 Kopien der speziellen DNA- Ziel- Sequenz synthetisiert, eine Menge, die nach einer Agarose- Gel- Elektrophorese als diskrete Bande mit einer bestimmten Größe zu erkennen ist. Diese Zyklen bestehen wiederum jeweils aus drei aufeinander folgenden Schritten: Zuerst erfolgt die Denaturierung der

DNA bei etwa 95°C, dann die Renaturierung bei 50°- 70°C. Der letzte Schritt beinhaltet die DNA- Synthese mittels einer hitzestabilen DNA- Polymerase und den vier Desoxyribonukleosidtriphosphaten dATP, dCTP, dGTP und dCTP bei etwa 70°- 75°C, wobei die neuen DNA- Stränge jeweils komplementär zu den einzelnen DNA- Strängen der gesuchten Zielsequenz sind. Zu den Vorteilen der PCR zählen die schnelle und einfache Durchführbarkeit dieser Methode wie auch die Empfindlichkeit, winzige Mengen einer Ziel- DNA zu vervielfältigen. Mit Hilfe von einer auf der Anwendung einer PCR basierenden Methode wie der allel- spezifischen Oligonukleotid (ASO)- Hybridisierung, kann nun durch direkte Genanalyse das CFTR- Gen auf das Vorhandensein von Mutationen, Deletionen und Insertionen untersucht werden (Kerem et al.,1989). Dieses Verfahren (Inno- LiPa CFTR12 und CFTR17+Tn) wird unter anderem angewandt von Dr. Ovens- Raeder, Fachärztin für Humangenetik, die bei einem Großteil unserer Patienten die genetische Beratung und Untersuchung vornahm. Darüber hinaus stehen heute eine Vielzahl diagnostischer Verfahren zur Verfügung, die meist auf dem Prinzip der reversen ASO- Hybridisierung, der allelspezifischen PCR oder dem Oligo- Ligations- Prinzip basieren und die gleichzeitige Analyse mehrerer Mutationen erlauben. Da etwa 70% der Mukoviszidose- Patienten Träger der dF508- Mutation sind und diese auch bei CAVD- Patienten als die am häufigsten identifizierte Mutation gilt, erscheint es naheliegend, im ersten Untersuchungsschritt die dF508- Mutation in der DNA des Betroffenen mit unbekanntem Genotyp nachzuweisen beziehungsweise auszuschließen. Als Beispiel für eine Vorgehensweise bei der CFTR- Mutationsanalyse siehe Tabelle 4.

Tabelle 4: CFTR- Mutationsanalyse

Schritt	Exon/ Intron	Primer	Nachweis/ Verdau	Mutation
1	Exon 10	CF16B CF16D	10% PAGE	dF508 dI507 1677delTA
2	Exon 7 Exon 11	7i3/ 7i5 11i3/ 11i5	HhaI HincII/ Mbol	R347P R553X

	Exon 11 Exon 21 Intron 19	542XBst/ 11i3 N1303KR/ N1303KD 1164/ 1159	BstNI DdeI HphI	G551D G542X N1303K 3849+10kbC>T
3	Exon 7 Intron 14b Intron 10 Intron 17a Exon 13 Exon 4	7i3/ 7i5 14Bi3I/ 14Bi5 11i5/ 1717 844/ 1036 1204/ 655 R117/ 4i3	MspI SspI SspI Avall PstI/ RsaI DdeI HaeIII	R334W I336K 2789+5G>A 1717-1G>A 3272-26A>G Y1092X 2143delT R117H

(Stuhrmann et al., 1998)

Weiterführende Schritte der Mutationsanalyse differieren allerdings in Abhängigkeit des durchführenden Instituts: im Institut für Humangenetik der Universität Göttingen wird nach einer Größenbestimmung durch PAGE des Exons 10 mittels Restriktionsverdau mit anschließender Elektrophorese die Exons 4, 7, 20, 21 und das Intron 10 und 19 untersucht, sowie das Exon 11 mittels Sequenzanalyse aufgeschlüsselt. Diese direkte Genotyp- Analyse erlaubt eine Aussage über das Vorkommen folgender Mutationen: R117H (Exon 4), R347P (Exon 7), dI507, dF508, 1677delTA (Exon 10), 1717-1(G>A) (Intron 10), G542X, S549R(A>C), S549R(T>G), S549N, S549I, G551S, G551D, 1784delG, R553Q, R553X, R560K, R560T (Exon 11), 3849+10kb(C>T) (Intron 19), W1282X (Exon 20), N1303 (Exon 21). Außerdem wurde mittels einer „nested- PCR“ und anschließender Sequenzierung des PCR- Produktes der Polypyrimidin- Trakt im Intron 8 des CFTR- Gens untersucht. Jedes Humangenetische Institut hat offensichtlich mittlerweile eigene Vorgehensweisen bei der Untersuchung des CFTR- Gens auf mögliche Mutationen etabliert, im Vordergrund steht aber in jedem Fall das Erzielen

einer möglichst hohen Detektionsrate. Unsere Patienten suchten in Abhängigkeit vom Wohnort zur molekulargenetischen Untersuchung verschiedene Humangenetische Institute in Deutschland auf, deren zu testendes Mutationsspektrum durchaus Unterschiede aufweist. Die häufigsten CFTR- Mutationen wie die dF508- Mutation oder die besonders bei CAVD- Patienten verbreitete R117H- Mutation (Bienvenu et al., 1993; Gervais et al., 1993; Williams et al., 1993) wurden in allen Fällen erfasst. Die typische, zu ca. 60% penetrante Mutation, die Spleißvariante IVS8-5T (Chillon et al., 1994; Zielenski et al., 1995) wurde erst in späteren genetischen Untersuchungen Teil der Routinediagnostik. Dennoch konnte diese Klasse 5 Mutation, die in der Allgemeinbevölkerung mit einer Frequenz von circa 5% auftritt (Dörk et al., 1997), bei einigen unserer Patienten nachgewiesen werden, da es innerhalb der verschiedenen Institute im Laufe der Zeit natürlich zu Aktualisierungen bei der Auswahl der durch Routinediagnostik untersuchten Mutationen kam. Da wir in unserer Studie retrospektiv einen Zeitraum von 1994 bis 2003 erfassen, und Nachforschungen zur Identifizierung weiterer CFTR- Mutationen heute noch bei weitem nicht abgeschlossen sind, sind die sich dadurch ergebenden Unterschiede in der Bandbreite der genetischen Diagnostik leider nicht zu vermeiden.

Tabelle 5: Mutationsspektren verschiedener genetischer Institute unter Berücksichtigung der erfolgten Aktualisierungen

Labor/ Institut	Zeitpunkt	Getestete Mutationen
Gemeinschaftspraxis Dr. Ovens- Raeder, Dr. Waldenmeier, München	1995	dF508, R117H, dI507, G542X, G551D, R553X, R347P, W1282X, N1303K, 1717-1G>A, 3849+10kbC>T, IVS8- 5T
	1996	+ 3272-26A>G, 2143delT, Y1092X, R334W
	1998	+ G85E, 621+G>T, Y122X, 711+G>T, 1078delT, R347H, , A445E, Q493X, V520F, 1677delTA, R560T, S549R, S549N, 2183AA>G, 2789+5G>A, 3849+4A>G, R1162X, 3659delC, 3905insT
	2001	+ E60X, S1251N

Humangenetisches Institut der LMU, München	1993	dF508, R347P, R553X, G542X, G551D, N1303K, W1282X
	1995	+3272-26A>G
	1999	+ R117H, 3272-26A>G, dI507
Humangenetisches Institut der Universität Ulm	1995	dF508, R117H, R347, dI507, 1717-1G>A, G542X, G551D, R553X, W1282X, N1303K, IVS8-5T
Humangenetisches Institut der Universität Göttingen	2003	dF508, R117H, R347P, dI507, 1677delTA, 1717-1G>A, G542X, S549RA>C, S549RT>G, S549N, S549I, G551S, G551D, 1784delG, R553Q, R553X, R560T, 3849+10kbC>T, W1282X, N1303K, IVS8-5T
Praxis für medizinische Genetik, Dr. Ebner, Regensburg	2001	dF508, R117H, dI507, Q493X, V520F, 1717-1G>A, G542X, G551D, R553X, R560T, S549R, S549N, 3849+10kbC>T, 3849+4A>G, R1162X, 3659delC, W1282X, 3905insT, N1303K, G85E, 621+1G>T, Y122X, 711+1G>T, 1078delT, R347P, R347H, R334W, A455E, 1898+1G>A, 2183AA>G, 2789+5G>A, IVS8-5T

Natürlich verhindern Unterschiede im getesteten Mutationsspektrum in Abhängigkeit vom jeweiligen Zeitpunkt und vom ausführenden Institut eine einheitliche Bewertung und Beurteilung des genetischen Befunds. In allen Fällen, in denen der Patient deutschen Ursprungs war, konnte laut untersuchendem Institut eine Detektionsrate von mindestens 80% bis 85% erreicht werden. Im Falle afghanischer und tunesischer Herkunft sank die Nachweischance auf 38%, bei türkischer Herkunft auf 33%, bei dem Patienten indonesischer Abstammung konnte über die Nachweiswahrscheinlichkeit von CFTR-Mutationen keine Aussage gemacht werden. Zu beachten gilt allerdings, dass sich solche Angaben zur Detektionswahrscheinlichkeit von CFTR-Mutationen auf CF-Patienten beziehen. Für Patienten mit kongenitaler Samenleiteraplasie wird aufgrund der vielbeschriebenen Heterogenität dieses Krankheitsbilds und der großteils noch unentdeckten Zahl an zugrundeliegenden Mutationen im CFTR-Gen eigentlich eine wesentlich geringere Nachweiswahrscheinlichkeit angenommen. Dörk et al. gehen davon aus, dass sich mit dem üblichen CF-Routineprogramm selbst wenn es um die

häufigsten CAVD- Mutationen wie die R117H- Missense- Mutation und die IVS8-5T- Spleißvariante erweitert wurde- dennoch lediglich auf 52% aller CAVD- Allele (56% der Allele von CAVD- Patienten ohne Nierenbeteiligung) Mutationen nachweisen lassen (Dörk et al., 1997). Durch erweiterte, aufwendigere Methoden wie beispielsweise die SSCP (single- stranded- conformation- polymorphism)- Analyse des gesamten CFTR- Gens, finden sich Mutationen immerhin auf etwa 79% aller CAVD- Allele (entsprechend 87% der CAVD- Patienten ohne Nierenbeteiligung) (Dörk et al., 1997). Diese Problematik wird neben weiteren Punkten in der sowohl vor als auch nach der molekulargenetischen Untersuchung erfolgenden genetische Beratung angesprochen. Als Definition genetischer Beratung wird die bereits 1974 von einem Ad Hoc Committee on Genetic Counseling der American Society of Human Genetics formulierte weiterhin anerkannt. Darin wird ausgeführt: „Die genetische Beratung stellt einen Kommunikationsprozess dar, in dem menschliche Probleme behandelt werden, die mit dem Auftreten oder der Möglichkeit des Auftretens einer Erbkrankheit in einer Familie zusammenhängen. Dieser Prozess beinhaltet das Bemühen einer entsprechend ausgebildeten Person, einem einzelnen oder einer Familie dazu zu verhelfen:

- medizinische Fakten einschließlich Diagnose, Krankheitsverlauf und Behandlungsmöglichkeiten zu verstehen
- die Bedeutung von Erbfaktoren in der Ätiologie einer Erkrankung zu verstehen und Erkrankungsrisiken für bestimmte Verwandte und Nachkommen richtig einzuschätzen
- die Entscheidungsmöglichkeiten bei der Verarbeitung von Erkrankungsrisiken zu verstehen
- diejenige Verhaltensweise zu wählen, die in Anbetracht eines Erkrankungsrisikos und der familiären Zielvorstellung angemessen erscheint und sich entsprechend dieser Einstellung zu verhalten“ (Epstein et al., 1975).

Diese Definition war wesentliche Vorlage für die Formulierung einer „Leitlinie zur Genetischen Beratung“ des Berufsverbandes Medizinische Genetik e.V. in ihrer aktualisierten Fassung aus dem Jahre 1996. Zum Beratungsablauf wird folgendes aufgeführt: Die Inanspruchnahme der Genetischen Beratung ist freiwillig. Sie darf nur

unter Einhaltung der für die ärztlichen Maßnahmen geforderten Rahmenbedingungen wie Aufklärungspflicht, Schweigepflicht, Datenschutz etc. durchgeführt werden. Über Ziele und Vorgehensweise sollte der Berater vorab informieren, in der Regel sollten diese Informationen schriftlich gegeben werden. Ebenso sollte der Ratsuchende sein Einverständnis zur Durchführung der genetischen Beratung schriftlich geben (aus: Berufsverband Medizinische Genetik e.V.: Leitlinien zur Genetischen Beratung).

Die genetische Beratung beginnt nun mit der Klärung der persönlichen Fragestellung und des Beratungsziels sowie der Erhebung der persönlichen und familiären Anamnese. Es folgen die Bewertung vorliegender ärztlicher Befunde beziehungsweise Befundberichte und, falls es für die Fragestellung von Bedeutung ist, auch die körperliche Untersuchung, die Untersuchung an Blut oder anderen Geweben, um eine möglichst genaue medizinisch- genetische Diagnose zu sichern. Neben ausführlicher Information über die in Frage stehenden Erkrankungen erfolgt die Abschätzung spezieller als auch allgemeiner genetischer Risiken samt der Erläuterung der möglichen Bedeutung dieser Informationen für die Lebens- und Familienplanung des Betroffenen (Kommission zur Erarbeitung von Richtlinien für die genetische Beratung des Berufsverbandes Medizinische Genetik e.V., 1994). Für unsere Patienten standen im Speziellen die sich für den Betroffenen selbst aus dem genetischen Befund ergebenden Konsequenzen, wie zum Beispiel ein relativ erhöhtes Risiko einer Spätmanifestation der Mukoviszidose, wie es für die Genotypen 2789+5G>A/2789+5G>A oder auch dF508/3272A>G beschrieben wird, sowie natürlich die Frage nach der Erkrankungswahrscheinlichkeit möglicher Nachkommen im Vordergrund. Eine Aussage über das Vererbungsrisiko der CAVD und auch, viel wichtiger noch, der vollständig ausgeprägten Form einer Cystischen Fibrose für die Nachkommen darf natürlich nur zusammen mit den Ergebnissen der Untersuchung der Partnerin getroffen werden. Dann allerdings kann dieses Vererbungsrisiko relativ gut eingegrenzt werden, da die Wahrscheinlichkeit für eine Mukoviszidose oder CAVD bei Nachkommen eines Betroffenen eigentlich im Wesentlichen vom Genträgerstatus der Partnerin abhängt (Stuhrmann et al., 1998). Ließe sich bei der Partnerin eine CFTR- Mutation im heterozygoten Zustand nachweisen, müsste von einer Erkrankungswahrscheinlichkeit einer Mukoviszidose samt CAVD bei männlichem Nachwuchs von bis zu 50% ausgegangen werden. Können hingegen die häufigsten CFTR- Mutationen- bei einer

Detektionsrate von 85% für CF- Patienten in der deutschen Population- ausgeschlossen werden, wie es bei allen Partnerinnen unserer CAVD- Patienten der Fall ist, sinkt die Erkrankungswahrscheinlichkeit der Nachkommen erheblich. Beträgt die a priori Heterozygotenwahrscheinlichkeit der Partnerin vor der genetischen Untersuchung noch 4%, so ergibt sich, falls bei einer Detektionsrate von etwa 85% keine CFTR- Mutation nachgewiesen werden kann, dann eine posteriore Heterozygotenwahrscheinlichkeit von nur mehr 0,6%. Ist der CAVD- Betroffene nun zum Beispiel compound heterozygot für eine schwere (Klasse 1 bis 3, zum Beispiel $\Delta F508$) und eine milde (Klasse 4 und 5, zum Beispiel IVS8-5T) CFTR- Mutation, ergibt sich für die Nachkommen eine Erkrankungswahrscheinlichkeit für eine typische Mukoviszidose von $1 \times 0,006 \times 0,25 = 0,0015$ (0,15%). In sehr seltenen Fällen (deutlich unter 1%) kann die Spleißvariante IVS8-5T in compound- Heterozygotie mit einer schweren CFTR- Mutation auch zu einer leicht ausgeprägten Mukoviszidose führen. Dieses Risiko geht allerdings im eben berechneten Gesamtrisiko von 0,15% auf. Die Erkrankungswahrscheinlichkeit für eine CAVD bei männlichem Nachwuchs beläuft sich in diesem Beispiel auf zusätzlich 0,09%, da die Klasse 5- Mutation IVS8-5T nur mit einer Penetranz von etwa 60% einhergeht. Weist der Genotyp des CAVD- Patienten hingegen eine compound- Heterozygotie für die Mutationen $\Delta F508/ R117H$ auf, erhöht sich, neben dem für die Nachkommen gleichermaßen bestehenden Erkrankungsrisiko für eine typische Mukoviszidose von 0,15% aufgrund der vollständigen Penetranz dieser Klasse 4 Mutation die Erkrankungswahrscheinlichkeit für eine mild ausgeprägte CF um zusätzliche 0,15%. Dieses im Rahmen der genetischen Beratung unserer CAVD- Patienten mit Kinderwunsch berechnete Risiko einer möglichen Vererbung einer Cystischen Fibrose an den Nachwuchs von insgesamt etwa 0,3% für unsere Patienten deutscher Herkunft, erscheint im Verhältnis mit dem Basisrisiko für eine Gesundheitsstörung Neugeborener von 3-4% durchaus tragbar. Das erklärt, warum sich trotz des Wissens um die Vererblichkeit der Erkrankung durch den Vater alle Paare für die Durchführung des mikrochirurgischen Eingriffs zur Spermengewinnung mit folgender künstlicher Befruchtung entschieden.

2.7 Schweißtest

Wie unter Punkt 1.5 Molekulare Konsequenzen der CFTR- Mutationen erläutert, wird die angeborene Samenleiteraplasie bei dem Großteil der Patienten verursacht durch Mutationen im - gleichfalls für die Cystische Fibrose verantwortlichen - CFTR- Gen und dann als monosymptomatische genitale Form der Mukoviszidose angesehen. Gelegentlich kommt es im Laufe der Jahre zu einer Ausprägung weiterer oder einer Verschlimmerung bereits latent bestehender Symptome der Mukoviszidose; der genaue Anteil an CAVD- Betroffenen, bei denen dies der Fall ist, ist allerdings nicht bekannt (Stuhrmann et al., 1998). Lediglich Tendenzen hinsichtlich des Risikos einer Spätmanifestation in Abhängigkeit von bestimmten Mutationen sind erkennbar, insbesondere für die Mutationen R117H, R334W, R347H, R352Q, 2789+5G>A und A455E wird ein höheres Diagnosealter angegeben (The Cystic Fibrosis Genotype Phenotype Consortium, 1993). Aus diesem Grund wird den CAVD- Patienten ohne Nierenbeteiligung neben der urologischen auch eine weiterführende internistische Untersuchung inklusive Schweißtest empfohlen. Obwohl vermutlich CFTR- Mutationen existieren, die mit einem nicht- pathologischen Schweißtest einhergehen, würde die Kombination von klinischer Untersuchung, genetischer Untersuchung und Schweißtest eine sicherere Aussage über den Zusammenhang der angeborenen Samenleiteraplasie des Patienten und der Erbkrankheit Mukoviszidose erlauben. Und eben dies wäre hinsichtlich der Einschätzung einer möglichen Spätmanifestation sowie der Vererblichkeit an die Nachkommen des Betroffenen von großer Wichtigkeit, besonders für die Patienten, bei denen die genetische Untersuchung nur teilweise (Heterozygotie für eine milde CFTR- Mutation) oder keinen Hinweis auf eine Beteiligung der im Routineprogramm untersuchten CFTR- Mutationen ergeben hat, was natürlich noch lange keine Beteiligung von CFTR- Mutationen ausschließt. Der Schweißtests bringt somit als ergänzendes, nicht- invasives Diagnostikum wichtige Erkenntnisse zur Beurteilung der CAVD als Teil der komplexen Phänotypen der „CFTRopathien“ (Tsui, 1991).

Der 1959 von Gibson und Cooke beschriebene Test zur Messung der Elektrolytkonzentration im Schweiß beruht auf der schon 1953 von di Sant'Agnese hergestellten Beziehung zwischen einer Mukoviszidose und stark erhöhten Natrium und

Chlorid- Werten im Schweiß dieser Patienten (di Sant'Agnesse et al., 1953). Diese hohen Elektrolytkonzentrationen sind, wie später nach Identifizierung des CFTR- Gens durch Studien zur Expression des CFTR belegt werden konnte, Folge einer fehlerhaften Ausbildung eines apikalen Anionenkanals (Riordan et al., 1993; Welsh et al., 1993). Je nach Klasse der zugrunde liegenden Mutation im CFTR- Gen werden gar keine oder zu wenig (Klasse 1, 2 und 5) oder in ihrer Funktion beeinträchtigte (Klasse 3 und 4) Chloridkanäle ausgebildet, was sich neben einer Beteiligung exokriner Drüsen in Lunge, Pankreas und Darm auch an den Schweißdrüsen der Haut manifestiert. Zahlreiche Bestimmungsverfahren zur Messung der Elektrolytkonzentration im Schweiß wurden entwickelt, wobei sich die von Gibson und Cookes beschriebene Pilocarpin-lontophorese als die Zweckmäßigste erwies: Die Schweißproduktion wird am Unterarm durch den Acetylcholinrezeptor- Agonist Pilocarpin stimuliert und die daraufhin produzierte Schweißmenge unter Luftabschluss, zum Beispiel mit einem NaCl- freien Filterpapier, gesammelt. Anschließend wird die gesammelte Menge Schweiß in Aqua bidest eluiert und der Natrium und/ oder Chloridgehalt im Eluat bestimmt. Das Analyseergebnis, natürlich umgerechnet auf die Menge gewonnenen Schweißes, wird nun mit bestehenden Grenzwerten verglichen: Natrium oder Chloridwerte über 70 mval/l sind beweisend für die Diagnose der Mukoviszidose, bei Werten zwischen 40 und 70 mval/l ist die Diagnose wahrscheinlich und der Test wird wiederholt, bei Werten unter 40 mval/ l gilt die Diagnose als sehr unwahrscheinlich. In seltenen Fällen kann ein pathologischer Schweißtest andere Ursachen als eine Mukoviszidose aufweisen, zum Beispiel kann auch eine Nebenniereninsuffizienz, ein Pseudohypoaldosteronismus, ein Hypothyreoidismus, ein Hypoparathyreoidismus, ein Diabetes insipidus für einen gestörten Elektrolythaushalt mit der Folge einer gestörten Schweißzusammensetzung verantwortlich sein (Welsh et al., 1995). Dennoch stellt der Schweißtest noch heute eines der wichtigsten Verfahren zur Erhärtung des klinischen Verdachts einer Mukoviszidose dar. Lediglich in spezialisierten Zentren stehen Verfahren zur sicheren Bestätigung oder zum weitgehenden Ausschluss der Diagnose Mukoviszidose zur Verfügung wie die Messung der Potentialdifferenz am Nasalepithel oder auch an der Rektalschleimhaut. Kein einziger unserer CAVD- Patienten kam allerdings der Empfehlung einer Durchführung des Schweißtests nach. Die Vorteile, die sich in Abhängigkeit des Ergebnisses für den Patienten ergeben hätten, erschienen dem

Einzelnen wohl nicht allzu überzeugend. Bei negativem Ergebnis hätte man mit großer Wahrscheinlichkeit das Bestehen einer mild ausgeprägten Mukoviszidose oder die Gefahr von sich später manifestierender pulmonaler und intestinaler Symptome ausschließen können, die bis auf den unerfüllten Kinderwunsch subjektiv beschwerdefreien Patienten legten auf diese Erkenntnis allerdings wenig Wert.

2.8 Therapiemöglichkeit

Eine Therapiemöglichkeit im herkömmlichen Sinne wie beispielsweise eine Tubulovasostomie erweist sich erfahrungsgemäß als wenig aussichtsreich bei Patienten mit angeborener Samenleiteraplasie. Folglich lässt sich die obstruktive Azoospermie nicht direkt beheben, ein bestehender Kinderwunsch kann allerdings mittels moderner mikrochirurgischer Eingriffen zur Spermengewinnung und nachfolgenden In-vitro-Fertilisationstechniken durchaus erfüllt werden. Die Kryokonservierung des gewonnenen Aspirats als zwischengeschalteter Schritt erleichtert dieses Vorgehen und wird daher heutzutage als Methode der ersten Wahl angesehen. Die kryokonservierten Spermien stehen dann nämlich für ein oder mehrere Versuche der künstlichen Befruchtung, die heute durch intracytoplasmatische Spermieninjektion (ICSI) erfolgt, zur Verfügung. Früher wurde die Eizelle meist nur durch eine in-vitro-Fertilisation (IVF) in Kontakt mit den Spermien gebracht, im Vergleich zur neueren Methode der ICSI jedoch waren die Erfolgsquoten eher gering. Mittels dieser neueren Vorgehensweise werden nun durchaus respektable Leistungen erzielt, so dass sich diese Methoden mittlerweile etabliert haben bei der Behandlung azoospermer Patienten mit Kinderwunsch.

2.8.1 Mikrochirurgische epididymale Spermienaspiration und testikuläre Spermienextraktion

Die mikrochirurgische epididymale Spermienaspiration (MESA) und die testikuläre Spermienextraktion (TESE) gelten heutzutage als die neuesten Vorgehensweisen auf dem Gebiet der assistierten Fertilisation. Sie erlauben eine Entnahme von vitalen

Spermatozoen bei Patienten, die an obstruktiver Azoospermie leiden. Seit 1989 werden diese Eingriffe in anfangs drei IVF- Zentren (Bonn, München und Stuttgart), seit 1993 in vielen weiteren Kliniken vorgenommen. Als Indikation gilt eine obstruktive Azoospermie bei intakter Spermatogenese, wie es bei der angeborenen Samenleiteraplasie und inoperablen Verschlüssen der Samenbläschen der Fall ist. Außerdem kann mit diesen Eingriffen Patienten mit konservativ nicht behandelbaren Ejakulationsstörungen ein Kinderwunsch ermöglicht werden. Auch nach misslungenen Refertilisationsversuchen und in Kombination mit Tubulovasostomie mit der Option der Kryokonservierung der gewonnenen Spermien werden diese Operationen als weitere Therapiemöglichkeit angeboten. Desweiteren wird eine TESE unter Umständen sogar bei Patienten mit nicht-obstruktiver Azoospermie oder mit einer Reifungsstörung durchgeführt, denn auch in diesen Fällen werden für gewöhnlich kleine Herde der Spermatogenese gefunden, die eine Spermengewinnung erlauben und somit diesen Patienten zu Nachwuchs verhelfen können (Silber et al., 1995).

Der mikrochirurgische Eingriff selbst verläuft nach standardisierten Methoden, durchgeführt unter Zuhilfenahme eines Mikroskops bei sechs- bis 24-facher Vergrößerung. Unter Allgemein- oder Lokalanästhesie beginnt der Operateur mit einem circa 3cm langem Skrotalschnitt. Nun wird der Hodeninhalt ausgestülpt und zusammen mit Nebenhoden und dem Gangsystem inspiziert und palpirt. Dabei kann dann letztendlich die Verdachtsdiagnose einer angeborenen Samenleiteraplasie in ein- oder beidseitiger Ausprägung bestätigt werden. Sobald die epididymale Serosa fenestriert ist, kann die freie Präparation des dilatierten Tubulussystem beginnen. Früher musste stets auf eine subtile Kauterisation geachtet werden, um einen Kontakt zwischen Spermatozoen und Erythrozyten zu verhindern, heute ist dies nicht mehr nötig, da das gewonnene Aspirat vor der Kryokonservierung labortechnisch gereinigt wird. Im nächsten Schritt wird nun die epididymale Flüssigkeit mit einer sterilen Glaspipette oder einer Teflonkanüle mit einem Durchmesser von 200 bis 300µm aspiriert. Können in diesem Aspirat bei der perioperativen mikroskopischen Untersuchung motile Spermatozoen nachgewiesen werden, wird es einer Ham's F10 HEPES Pufferlösung zugefügt. Anschließend wird die Inzision mikrochirurgisch unter Verwendung eines 10-0 Fadens verschlossen. Können jedoch, auch nach multipler beidseitiger Präparation der Serosa sowie bei der Eröffnung des Tubulusapparates, keinerlei vitale Spermienformen

gewonnen werden, muss eine testikuläre Spermienextraktion folgen, wobei sich zentrale Biopsate meist ergiebiger als Oberflächliche erweisen. Das hierbei gewonnene Biopsiematerial wird in ein Transportmedium gebracht und darauffolgend für die Isolierung vitaler Spermatozoen verwendet (Schwarzer et al., 2003).

Unsere Patienten wurden nach Diagnosestellung und Aufklärung über weitere Behandlungsmöglichkeiten meist in die Frauenklinik Dr. Krüsmann in München überwiesen, ein Zentrum für gynäkologische Endokrinologie und Sterilitätsmedizin. Eine hervorragende Infrastruktur erlaubt dort ein Neben- und Miteinander verschiedener Disziplinen: Ein Urologe nimmt die mikrochirurgischen Eingriffe zur Spermengewinnung, also MESA und TESE, vor. Dies geschieht in einem speziellen andrologischen, extra für Eingriffe dieser Art ausgestatteten Operationssaal, direkt neben den andrologischen Labors. Dadurch wird sowohl eine sofortige Aufbereitung des Aspirats oder der Biopsate gewährleistet, als auch eine rasche Auskunft darüber ermöglicht, ob und in welcher Menge und Qualität Spermatozoen gefunden wurden. Dieser Befund ist dann ausschlaggebend dafür, ob die Prozedur beendet werden kann oder an anderer Stelle weitergeführt werden muss. Ein solches Höchstmaß an Individualisierung des operativen Eingriffs ist nur möglich durch das Konzept der engen räumlichen, personellen und organisatorischen Verzahnung.

2.8.2 Aufbereitung der Biopsate

Besonders im Falle der testikulären Spermienextraktion spielt nun die Aufbereitung der Biopsate eine entscheidende Rolle. Nachdem ein kleiner Teil des entnommenen Gewebes für die histologische Untersuchung abgetrennt wurde, wird zunächst versucht, die Samenkanälchen des verbleibenden Teils mechanisch auszumelken, restliches Gewebe wird einfach gequetscht. Eine erste Aussage über das Vorhandensein von Spermatozoen kann nun getroffen werden; außerdem kann die Anzahl der Spermatozoen grob überschlagen werden. Im nächsten Schritt erfolgt eine Suspension in Kulturmedium und ein Pooling aller Proben, sobald die Operation beendet ist. In Abhängigkeit des Grades der Verunreinigung mit anderen Zellelementen und der Spermatozoendichte werden diese Proben entweder über Percollgradienten oder durch einfache Pelletierung und Resuspension gereinigt. Nach den Reinigungsschritten wird

nun die Probe auf 1ml Medium resuspendiert, um eine gewisse Standardisierung zu erreichen. Nun wird ein Spermogramm erstellt und je nach Spermatozoendichte das Endvolumen entweder durch Pelletierung und erneute Suspension vermindert oder durch Zugabe von Medium erhöht. Im letzten Schritt erfolgt eine Portionierung in Straws (meist 10 bis 12) und die Kryokonservierung (Würfel et al., 1998). Ein Alternativkonzept zur sogenannten Kryo- TESE besteht darin, die bei dem operativen Eingriff gewonnenen Proben sofort zu kryokonservieren und erst unmittelbar vor der geplanten ICSI wieder aufzutauen und erst dann mit der Aufbereitung der Biopsate zu beginnen. Anhand von histologischen Schnitten soll im Vorfeld das Vorhandensein von Spermatozoen belegt werden. Als Argument für dieses Verfahren wird angeführt, dass sich eine In- toto-Kryokonservierung günstiger im Sinne einer Kryoprotektion auf die Spermatozoen auswirkt (Salzbrunn et al., 1996). Ein wesentlicher Nachteil dieser Methode besteht allerdings darin, dass besonders bei ausgeprägten testikulären Insuffizienzen die verbleibende Spermio-genese nicht homogen über das gesamte Hodengewebe verteilt ist und als Folge dessen erhebliche Variationen hinsichtlich des Spermatozoengehalts auftreten können. Außerdem besteht bei einer sofortigen Aufbereitung eines Biopsats die Möglichkeit, dass sich unerwarteter Weise doch noch Spermatozoen finden, die sich für eine spätere Behandlung mit ICSI eignen, obwohl in dem histologischen Schnitt keine nachweisbar waren. Eine homogene Suspension ermöglicht zudem eine zuverlässige Portionierung der Spermatozoen, so dass bei späteren Fertilisationsversuchen mittels ICSI die Zahl der Straws, die aufzutauen sind, präzise gewählt werden kann (Würfel et al., 1998). Aber auch hinsichtlich der Aufbereitung der Biopsate existieren durchaus alternative Vorschläge: andere Institute bevorzugen eine Spermengewinnung aus den Proben mittels enzymatischer Andauung. Es bleibt im Prinzip dem jeweiligen Zentrum überlassen, mittels welcher Mittel und Methoden es dem betroffenen Paar eine höchstmögliche Erfolgsrate bei der Erfüllung ihres Kinderwunsches anbietet.

Insgesamt lässt sich festhalten, dass zufriedenstellende Behandlungsergebnisse bei der Therapie infertiler Paare hohe Anforderungen stellen an die Organisation und das ausführende Personal eines solchen „Kinderwunsch- Zentrums“, in dem interdisziplinär eng zusammengearbeitet werden muss, um den Erfolg einer Behandlung zu sichern.

2.8.3 Kryokonservierung

Die Methode der Kryokonservierung als Zwischenschritt nach der Gewinnung der Spermien und vor der künstlichen Befruchtung der Eizelle führte in den letzten Jahren zu einer erheblichen Erleichterung der Logistik und Organisation bei reproduktiven Eingriffen und ist deshalb für die klinische Routine als erste Wahl anzusehen. Für jeden einzelnen Behandlungszyklus der Ehefrau musste früher ein operativer Eingriff (MESA/TESE) durchgeführt werden, um die nötigen Spermatozoen zu gewinnen. Dies stellt nicht nur eine erhebliche Belastung für den Ehemann dar, es wird auch operationstechnisch immer problematischer, eine zunehmende Anzahl von Hodenbiopsien in relativ kurzem zeitlichem Abstand zu wiederholen. Außerdem muss der mikrochirurgische Eingriff zur Spermengewinnung zeitlich genau abgestimmt werden auf den Termin des Eisprungs der Partnerin, damit die Eizelle quasi zeitgleich entnommen und direkt nach der künstlichen Befruchtung wieder implantiert werden kann. Dieses simultane Vorgehen der Follikelpunktion und MESA/TESE erfordert extreme Flexibilität nicht nur der Patienten, sondern auch des beteiligten medizinischen Personals. Sie alle müssen in Bereitschaft gehalten werden, um im richtigen Moment zur Verfügung zu stehen; nur so kann ein Gelingen der Behandlung infertiler Paare durch künstliche Befruchtung überhaupt erwartet werden. Ein Ansatz zur Lösung dieser nicht unerheblichen logistischen und organisatorischen Probleme wäre die Kryokonservierung von deutlich mehr als drei Vorkernstadien gewesen, um in darauffolgenden Behandlungszyklen auf erneute chirurgische Eingriffe und Eizellentnahmen verzichten zu können. Die vorsätzliche Befruchtung von mehr als drei Eizellen ist nach dem Embryonenschutzgesetz (ESchG) jedoch nicht statthaft, weshalb hierin keine wirkliche Therapiealternative zu sehen ist. Zudem ist aus medizinischer Sicht zu berücksichtigen, dass die Schwangerschaftsraten nach Kryokonservierung niedriger sind als die mit nativen, also nicht- kryokonservierten Vorkernstadien. Aus diesen Gründen wird nun das Konzept der Kryokonservierung der gewonnenen Spermien verfolgt, um diese zum gewünschten Zeitpunkt dann wieder aufzutauen und für die ICSI verwenden zu können. Und spätestens seit in Studien zur Kryokonservierung der Spermien nachgewiesen werden konnte, dass sich hinsichtlich der erfolgten Schwangerschaftsrate keinerlei Unterschied zwischen frischen und kryokonservierten Spermien bemerkbar macht,

gehört dieser Zwischenschritt zum Standard- Prozedere bei derartigen Eingriffen (Silber et al., 1995). Der operative Eingriff beim Mann kann nun unabhängig vom Zyklus der Frau geplant werden. Außerdem besteht nun bei eigentlich nur explorativ geplanten Eingriffen jederzeit die Möglichkeit der Spermienaspiration für spätere eventuelle künstliche Befruchtungen. Die Spermienengewinnung muss zudem nicht jedes Mal durch eine erneute Operation erfolgen falls, wie in den meisten Fällen, mehr als ein Versuch zur Befruchtung nötig sein sollte. Eine Kryokonservierung erlaubt mehrmalige Versuche der in- vitro- Fertilisation beziehungsweise ICSI, da die Spermien jeweils nur portionsweise aufgetaut werden. Eine eben gerade so große Menge, wie für einen Befruchtungsversuch der Eizelle nötig ist, wird also aufgetaut, wobei die verbleibende Menge der Spermien für eventuelle spätere Befruchtungen weiterhin kryokonserviert zur Verfügung steht. Im Durchschnitt reicht die bei der MESA und/ oder TESE gewonnenen Spermienmenge für etwa fünf Befruchtungen aus, erst dann muss ein erneuter Eingriff zur Spermienengewinnung stattfinden. Und falls trotz multilokulären beidseitigen Biopsien keinerlei Spermienformen gefunden werden können, lassen sich unnötige Behandlungen der Frau vermeiden. Insgesamt wird die eventuelle Erhöhung der Kosten für die Behandlung infertiler Paare mit MESA/ TESE und nachfolgender ICSI durch diesen heutzutage zwischengeschalteten Schritt der Kryokonservierung gerne in Kauf genommen, da die dadurch gewonnene logistische und organisatorische Erleichterung bei der Durchführung der Behandlung diese bei Weitem aufwiegt. Und da sich hinsichtlich der Schwangerschaftsrate keine nachteiligen Auswirkungen bemerkbar machen, sondern durchaus vergleichbar gute Ergebnisse erzielen lassen, gehört dieser Zwischenschritt mittlerweile zum Standard-Programm bei dieser Form der Therapie kinderloser Paare.

2.8.4 Intrazytoplasmatische Spermieninjektion

Neben Patienten mit obstruktiver Azoospermie gilt die intrazytoplasmatische Spermieninjektion (ICSI) mittlerweile sogar bei Patienten, deren Azoospermie nicht-obstruktiver Genese ist, sondern durch mangelhafte Produktion und Ausreifung der Spermien verursacht wird, als erfolgreich durchführbar. Einzig für Patienten, bei denen weder Spermatozoen noch Spermid- Formen im Hoden ausfindig gemacht werden

können, wird ein Therapieversuch mit dieser Methode als chancenlos angesehen; jedoch machen die von dieser schweren Art von Unfruchtbarkeit Betroffenen einen sehr geringen Prozentsatz aus (Silber, 1998). Woher die Spermien für die künstliche Befruchtung stammen und welche Ursache für die Azoospermie nun in Frage kommt, hat augenscheinlich keine Auswirkung auf den Erfolg dieser Prozedur: epididymale Spermien, die mittels MESA gewonnen werden, erzielen vergleichbar hohe Schwangerschaftsraten wie die aus dem Hoden mittels TESE gewonnenen Spermien (Silber et al., 1995). Hinsichtlich der Motilität unterscheiden sich epididymale zwar sehr wohl von testikulären Spermien, sogar innerhalb des Nebenhodens besteht ein Gefälle von Spermatozoen aus dem proximalen Teil mit der höchsten Motilität über solche aus dem distalen Teil mit mäßiger Motilität bis hin zu den testikulären Formen, die meist nur ortsständig motil oder sogar vollständig immotil sind. Das Kriterium der Motilität kann bei dem Verfahren der intrazytoplasmatischen Spermieninjektion jedoch im Gegensatz zur herkömmlichen in- vitro- Fertilisation, bei der eine Befruchtung der Eizelle mit testikulären Spermien nahezu unmöglich war, außer Acht gelassen werden.

Was den Behandlungszyklus der Frau betrifft, wird in der Dr. Krüsmann- Klinik folgendermaßen verfahren: nach hormoneller Niederregulation durch ein GnRH- Analogon wird eine Stimulation mit Gonadotropinen (FSH, hMG) durchgeführt. Mit 150 I.E. pro Tag als Einstiegsdosis wird begonnen, und zwar ab dem dritten Zyklustag. Unter Ultraschallkontrolle erfolgt die Eizellentnahme transvaginal, immer in Beisein eines Anästhesisten und meist unter Analgosedierung (Würfel et al., 1998). Die technische Durchführung der ICSI erfolgt, indem ein einzelnes Spermatozoon in das Zytoplasma einer befruchtbaren Metaphase II- Eizelle injiziert wird (van Steirteghem et al., 1993). Der Embryotransfer erfolgt intrauterin unter Zuhilfenahme eines gebogenem Wallace- Katheders.

Die Lutealphase wird üblicherweise gestützt mit 3x 1500 I.E. hCG und 3x 200mg Progesteronkügelchen intravaginal. Der Schwangerschaftsnachweis gelingt bei erfolgreicher Implantation nach zwei Wochen mittels hCG- Bestimmung im Urin, nach etwa fünf Wochen ist eine bildliche Darstellung der eingenisteten Eizelle in der Uterusschleimhaut möglich.

Die Erfolgsquoten bei der Behandlung infertiler Paare konnte seit 1992 mit der Einführung dieser neuen assistierten Reproduktionstechnik erheblich verbessert werden.

Die Embryotransferrate nach MESA (TESE) und ICSI liegt in etwa bei 68,2% (84,6%), die Schwangerschaftsrate bei 18,4% (23,1%) (Ergebnisse der Sektion Mikrochirurgie der Deutschen Gesellschaft für Urologie, Zumbé et al., 1996). Neuere Studien von Vernaeve et al., die nur Ergebnisse von Patienten mit obstruktiver Azoospermie einbeziehen, geben die erzielte Schwangerschaftsrate nach einmaliger TESE und ICSI mit 24,0% an (Vernaeve et al., 2003). Den Daten zufolge, die 1998 von der mit uns in enger Zusammenarbeit stehenden Frauenklinik Dr. Krüsmann veröffentlicht wurden, können Schwangerschaftsraten von 21,2% pro Behandlungszyklus und 23,5% pro Embryotransfer (Embryotransferrate 90%) erreicht werden. Mit im statistischen Durchschnitt 2,3 transferierten Präimplantationsembryonen kann so eine kumulative Schwangerschaftsrate von 41,7% erzielt werden (Würfel et al., 1998).

Tabelle 6: Ergebnisse der ICSI unserer 62 CAVD- Patienten

Patienten insgesamt: Σ 62			
ICSI erfolgreich: 31 (50%)	1 Kind: 22 (35,5%) [71,0%]	Zwillinge: 6 (9,7%) [19,4%]	2 Kinder: 3 (4,8%) [9,7%]
ICSI ohne Erfolg: 31 (50%)	Behandlung abgebrochen: 8 (12,9%) [25,8%]	Behandlung läuft noch: 14 (22,6%) [45,2%]	Kontakt abgebrochen u.a.: 8 (12,9%) [25,8%]

(): Prozentualer Anteil bezogen auf die insgesamt 62 CAVD- Patienten

[]): Prozentualer Anteil bezogen auf die jeweils 31 Patienten mit erfolgreicher beziehungsweise nicht erfolgreicher Behandlung

Aufgrund mehrerer bereits fehlgeschlagener Versuche wurde die Behandlung von acht Paaren abgebrochen, da trotz zunehmender Zahl an ICSI- Versuchen die Wahrscheinlichkeit für eine Schwangerschaft als nicht mehr steigerbar gilt. Außerdem ist die Finanzierung dieses Eingriffs von den Kassen auf eine gewisse Anzahl von Versuchen - meist zwischen drei und fünf- begrenzt, weitere Versuche müssen vom Patienten selbst bezahlt werden. Insgesamt 14 Patienten befinden sich momentan noch in unserer Behandlung, vermutlich werden in Kürze noch einige Schwangerschaften und Geburten zu verzeichnen sein. Sechs Patienten brachen aufgrund von Umzügen oder anderen persönlichen Beweggründen den Kontakt zu uns beziehungsweise zur weiterbehandelnden Frauenklinik Dr. Krüsmann ab, so dass uns keine Informationen über den weiteren Verlauf der Behandlung zur Verfügung stehen. Ein Patient verzichtete bewusst auf die Kryokonservierung der bei der mikrochirurgischen Exploration gewonnenen Spermien und damit auf einen Befruchtungsversuch mittels ICSI. Tragischerweise verstarb die Partnerin eines unserer Patienten in der Vorbereitungsphase auf die ICSI.

Betrachtet man die Ergebnisse der erfolgreich verlaufenen Befruchtungsversuche, so wird offensichtlich, dass neben 22 Einlingsschwangerschaften sechs Zwillingschwangerschaften verzeichnet wurden. Ausgehend von insgesamt 31 Paaren, deren Fertilisation erfolgreich verlief, bedeutet dies eine Zwillingsrate von 19,4%. Im Verhältnis zur Zwillingsrate in der Allgemeinbevölkerung ist dieser Anteil an Zwillingsgeburten deutlich erhöht. Obwohl eine Reduktion der Mehrlingsschwangerschaften als erklärtes Ziel der European Society of Human Reproduction and Embryology gilt, wird neuesten Ergebnissen zufolge auch im Jahre 2002 die Zwillingsrate nach künstlichen Befruchtungen europaweit bei 24,0% liegen (Nygren et al., 2001). Der Grund dafür liegt vermutlich bei der Durchführung des Embryotransfers mit durchschnittlich 2,3 Embryonen pro Befruchtungszyklus. Letztendlich wird die Zahl an transferierten Embryonen immer ein Kompromiss sein, um einerseits eine gewisse Wahrscheinlichkeit für das Gelingen des Transfers und der Einnistung von Embryonen zu gewährleisten und andererseits Mehrlingsschwangerschaften (Drillinge und mehr) auszuschließen, da diese natürlich immer ein erhöhtes gesundheitliches Risiko sowohl für die Feten als auch für die Mutter bergen. Außer der Gefahr einer Mehrlingsschwangerschaft, meist Zwillinge (die

Drillingsrate nach künstlicher Befruchtung liegt bei 2,2%), ist das Risiko für angeborene Fehlbildungen oder chromosomale Abnormitäten nicht erhöht. Zu solchen Ergebnissen gelang man aufgrund extensiver genetischer und pädiatrischer Follow-up-Studien bezüglich ICSI-Schwangerschaften: das Risiko für kongenitale Malformationen liegt bei 2,6%, für gonosomale Abnormitäten bei etwa 1,0% und auch das Risiko für autosomale de-novo Abnormitäten scheint nicht erhöht zu sein. Silber nennt diese Ergebnisse sehr beruhigend, obwohl er dennoch auf die Wichtigkeit einer ausführlichen genetischen Beratung von infertilen Paaren hinweist (Silber et al., 1998). Bei Untersuchungen von 305 Paaren konnten insgesamt bei 3,3% nach ICSI geborene Individuen kongenitale chromosomale Abweichungen identifiziert werden (van der Ven et al., 1998), van Steirteghem beschreibt in seinem Bericht über die letzten zwanzig Jahre der in-vitro-Fertilisation eine leichte, aber signifikante Steigerung der Zahl an gonosomalen Aneuploidien und strukturellen de-novo Aberrationen, wobei schwerere angeborene Malformitäten allerdings offensichtlich gleichermaßen bei durch ICSI und konventioneller IVF wie auch bei auf natürlichem Wege entstandenen Nachwuchs auftreten (van Steirteghem, 2001).

3. Ergebnisse

3.1 CFTR- Mutationen bei Patienten mit kongenitaler Samenleiteraplasie

Bis auf zwei Ausnahmen (Patienten 8, 51) - in diesen beiden Fällen lag uns kein schriftlicher Befund der genetischen Untersuchung vor, weshalb das Vorhandensein von Mutationen (trotz mündlicher Bestätigung beziehungsweise handschriftlichem Vermerk) nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden kann- wurde bei allen an unserer Untersuchung teilnehmenden Patienten die Routinediagnostik zur Untersuchung des auf Chromosom 7 lokalisierten CFTR- Gens durchgeführt und dokumentiert. Somit konnten durch die Auswertung der Krankenakten mögliche Zusammenhänge zwischen der

kongenitalen Samenleiteraplasie und fraglich ursächlicher CFTR- Mutation(en) hergestellt werden.

Schwierigkeiten bei der vergleichenden Beurteilung bereitet allerdings die Tatsache, dass die genetischen Befunde der Patienten in einem Zeitraum von 1994 bis 2003 an verschiedenen genetischen Instituten innerhalb Deutschlands erstellt worden sind. Das bedeutet, dass die untersuchten Mutationsspektren Unterschiede aufweisen, was möglicherweise die Wahrscheinlichkeit der Identifizierung der CFTR- Mutationen beeinflusst haben könnte. Einen Überblick der zum jeweiligen Zeitpunkt getesteten Mutationen gibt Tabelle 5: Mutationsspektren verschiedener genetischer Institute unter Berücksichtigung erfolgter Aktualisierungen, Punkt 2.6, Genetische Untersuchung. Lediglich die sowohl bei der Cystischen Fibrose als auch bei der CAVD am häufigsten auftretende Mutation, nämlich die $\Delta F508$ - Mutation (Klasse 2 Mutation) , die sich auf ca. 70% aller weltweit untersuchten CF- Allele befindet und die insbesondere mit der CAVD assoziierten R117H- Mutation wurde in allen, die bei CAVD- Betroffenen ebenfalls häufige Spleißvariante IVS8-5T immerhin in den meisten Fällen in die Diagnostik miteinbezogen.

3.1.1 CFTR- Mutationen bei Patienten mit kongenitaler bilateraler Samenleiteraplasie

Die Tabelle 7 bietet einen ersten Überblick über die Art und Häufigkeit der Mutationen, die eigenen Untersuchungen zufolge mit einer beidseitigen Samenleiterfehlanlage einhergehen.

Tabelle 7: CFTR- Genotypen unserer 53 CBAVD- Patienten

CF/ CF	CF/ CBAVD	CF/ N	CBAVD/ N	N/ N
4 (7,5%)	16 (30,2%)	10 (18,9%)	8 (15,1%)	3 (5,7%) mit Nierenbeteiligung, 12 (22,6%) ohne Nierenbeteiligung

CF: Mutationen der Klassen 1 bis 3, sowie einige Mutationen der Klasse 4 und 5, bei denen eine Mukoviszidose- verursachende Wirkung nachgewiesen oder sehr wahrscheinlich ist.

CBAVD: Mutationen der Klasse 4 und 5, die mit einer CBAVD assoziiert sind.

N: keine CFTR- Mutation nachgewiesen

(): Relative Häufigkeit der Mutationen

Bei vier unserer Patienten (7,5%) war eine milde Form der Mukoviszidose bereits vor Aufsuchen der urologischen Praxis aufgrund des unerfüllten Kinderwunsches bekannt, jeweils beide Allele des Chromosoms 7 tragen eine für die Cystische Fibrose typische schwere CFTR- Mutation. In zwei Fällen wurde eine Homozygotie für die $\Delta F508$ - Mutation nachgewiesen (Patienten 14, 42), bei den beiden anderen Patienten handelt es sich um Brüder, deren Genotyp beide Male sowohl für die $\Delta F508$ - als auch für die $3272-26A>G$ - Mutation homozygot ist (Patienten 12, 15). Der jüngere der Brüder (Patient 12) verstarb im Laufe unserer Untersuchungen an den Folgen der sich spät manifestierten Mukoviszidose. Bei 16 von 53 CBAVD- Patienten (30,2%) konnte eine sogenannte compound- Heterozygotie für eine schwere und eine milde CFTR- Mutation nachgewiesen werden. Das heißt, ein Allel in dem auf Chromosom 7 lokalisierten CFTR- Gen trägt eine Mutation, die der Klasse 1 bis 3 angehört und in homozygotem Zustand in engem Zusammenhang mit einer Mukoviszidose- Manifestation steht. Da auf dem homologen Allel eine milde Mutation der Klasse 4 oder 5 vorliegt, äußert sich dieser Genotyp meist nur in Form einer ansonsten weitgehend symptomlosen genitalen Fehlbildung, der angeborenen Samenleiteraplasie. Ähnliches gilt für die 10 beziehungsweise 8 Patienten (18,9% und 15,1%), bei denen neben einer entweder „schweren CF-“ oder „milden CBAVD- Mutation“ das homologe Allel nicht von einer CFTR- Mutation betroffen zu sein scheint- wobei natürlich die Möglichkeit nicht auszuschließen ist, dass eine zweite Mutation noch existiert, diese allerdings zu selten ist, um in der Routinediagnostik miterfasst zu werden. Drei der CBAVD- Patienten lieferten neben der Samenleiteraplasie noch den Befund einer einseitigen Nierenaplasie, wodurch die Wahrscheinlichkeit des Auftretens von CFTR- Mutationen mehreren Studien zufolge gegenüber der Allgemeinpopulation womöglich als nicht erhöht einzustufen ist (siehe Punkt 1.8.2. Die kongenitale Samenleiteraplasie mit Nierenbeteiligung). Verbleiben somit zwölf von 53 CBAVD- Patienten (22,6%), bei denen

der Grund für das Fehlen einer nachweisbaren CFTR- Mutation nicht offensichtlich ist. Immerhin bei 20 der CBAVD- Patienten konnte eine Homo- beziehungsweise eine compound- Heterozygotie, bei 18 eine Heterozygotie für eine Mutation im CFTR- Gen nachgewiesen werden. Im Folgenden interessiert nun, welcher Genotyp mit welcher Häufigkeit bei unseren Patienten vertreten ist.

Tabelle 8: Häufigkeit der CFTR- Genotypen bei 38 CBAVD Patienten mit nachgewiesener CFTR- Mutation

Genotyp	Art der Mutation	Diagnose	Häufigkeit (relative)
DF508/ R117H	Klasse 2/ 4	CBAVD	8 (21,1%)
DF508/ IVS8- 5T	Klasse 2/ 5	CBAVD	6 (15,8%)
DF508; IVS8-5T/ IVS8-5T	Klasse 2; 5/ 5	CBAVD	1 (2,6%)
DF508/ L1388Q*	Klasse 2/ *	CBAVD	1 (2,6%)
DF508 / dF508	Klasse 2/ 2	CF, CBAVD	2 (5,3%)
DF508/ dF508 3272A>G/ 3272A>G	Klasse 2/ 2	CF, CBAVD	2 (5,3%)
DF508/ N	Klasse 2/ N	CBAVD	9 (23,8%)
R117H/ N	Klasse 4/ N	CBAVD	3 (7,9%)
IVS8- 5T/ N	Klasse 5/ N	CBAVD	4 (10,5%)
W1282X/ N	Klasse 1/ N	CBAVD	1 (2,6%)

G551D/N	Klasse 3/ N	CBAVD	1 (2,6%)
---------	-------------	-------	----------

N: keine Mutation nachgewiesen

(): Häufigkeit des Genotyps bezogen auf die 38 Patienten mit nachgewiesenen Mutationen

*Für diese Mutation im CFTR- Gen konnte ich keine Einteilung in die Klassen 1 bis 5 finden, aufgrund des Auftretens in Zusammenhang mit einer CBAVD kann jedoch von einer milden Mutation der Klasse 4 oder 5 ausgegangen werden.

Die mit Abstand häufigsten Genotypen in unserem Kollektiv waren die dF508- Mutation entweder heterozygot vorliegend (23.8%), oder kombiniert mit der Missense- Mutation R117H (21,1%) beziehungsweise mit der Spleißvariante IVS8-5T (15,8%), die schwere Klasse 2- Mutation heterozygot oder compound- heterozygot vorliegend mit der milden Klasse 4- beziehungsweise Klasse 5- Mutation als typischer CBAVD- Genotyp. Insgesamt sieben verschiedene Mutationen konnten im Genom unserer CBAVD- Patienten mittels Routinediagnostik identifiziert werden. Einen genauen Überblick über die Häufigkeitsverteilung dieser Mutationen soll die folgende Tabelle 9 geben.

Tabelle 9: Absolute (relative) Häufigkeit der detektierten CFTR- Mutationen

Mutation:	dF508	IVS8-5T	R117H	3272-26A>G	L1388Q	W1282X	G551D
CBAVD- Patienten	25 (65,8%)	11 (28,9%)	11 (28,9%)	0	1 (2,6%)	1 (2,6%)	1 (2,6%)
CF- Patienten	4 (10,5%)	0	0	2 (5,3%)	0	0	0
Gesamt	29 (76,3%)	11 (28,9%)	11 (28,9%)	2 (5,3%)	1 (2,6%)	1 (2,6%)	1 (2,6%)

(): relative Häufigkeit der CFTR- Mutationen, bezogen auf die 38 CBAVD- Patienten mit detektierten Mutationen

Die Ergebnisse zeigen, dass die bei CF- Patienten der kaukasischen Bevölkerung bekanntermaßen häufigste Mutation im CFTR- Gen, der Basenaustausch an Position

508, auch die bei unseren CBAVD- Patienten die am häufigsten nachgewiesene Mutation darstellt. Von insgesamt 38 Patienten, die Träger von Mutationen sind, tragen 29 entsprechend 76,3% aller CBAVD- Patienten mit nachgewiesener Mutation die dF508- Mutation, wobei von den vier dafür homozygoten Patienten je nur ein Allel in der Tabelle berücksichtigt wurde. Je elf unserer CBAVD- Patienten erwiesen sich als Träger der Missense- Substitution R117H oder der Spleißvariante IVS8- 5T, was einer relativen Häufigkeit von 28,9% für das Auftreten dieser Mutationen entspricht- wiederum gesetzt den Fall, dass eine Mutation detektiert wurde. Somit wird an dieser Stelle ein besondere Zusammenhang zwischen der Klasse 4- Mutation R117H und der Spleißvariante IVS8- 5T und der primär genitalen Form der Mukoviszidose, der angeborenen Samenleiteraplasie erkennbar. Von den vier weiteren, in unserem Kollektiv detektierten Mutationen, trat der 3272-26A>G- Basenaustausch, von dem das Brüderpaar betroffen war zweimal auf, die L1388Q, W1282X und die G551D- Mutation nur je einmal in Erscheinung. Bestimmt man nun die Allelfrequenz der detektierten Mutationen unserer 53 CBAVD- Patienten und erstellt hiervon eine Tabelle, so lassen sich unsere Ergebnisse beispielsweise gut mit Ergebnissen aus Untersuchungen der 106 CBAVD- Patienten aus Dörks Kollektiv vergleichen (Dörk et al., 1997).

Tabelle 10: Allelfrequenz der CFTR- Mutationen unserer 53 CBAVD- Patienten (extra unterteilt: 4 CF- Patienten)

Mutation	4 CF Patienten (8 Allele)	49 CBAVD- Patienten (98 Allele)	106 CBAVD- Patienten aus Dörks Kollektiv (212 Allele)
DF508	8 (100%)	25 (25,5%)	57 (26,9%)
IVS8- 5T	-	12 (12,2%)	26 (12,3%)
R117H	-	11 (11,2%)	24 (11,3%)
3272-26A>G	4 (50%)	-	2 (0,9%)
L1388Q	-	1 (1,0%)	1 (0,5%)

W1282	-	1 (1,0%)	1 (0,5%)
G551	-	1 (1,0%)	-

Die vier CF- Patienten wurden gesondert von den Patienten dargestellt, die aufgrund der CFTR- Mutationen „nur“ von einer angeborenen Samenleiteraplasie betroffen sind, da sich unsere Untersuchungen ja strenggenommen eben nur auf CAVD- Patienten beziehen und nicht zusätzlich Mukoviszidose- Patienten mit Samenleiteraplasie einschließen.

Mit 25,5% stellt der Basenpaaraustausch in Position 508 die Mutation dar, von der die meisten Allele unserer CBAVD- Patienten betroffen sind. Aber auch die Missense-Substitution R117H konnte relativ häufig im Genom unserer CBAVD- Patienten identifiziert werden. Verglichen mit der Allelfrequenz deutscher CF- Patienten, die bei etwa 0,3% liegt, ist die Frequenz dieser Klasse 4- Mutation von 11,2% der Allele unserer Patienten mit Samenleiteraplasie deutlich erhöht, was den längst geforderten Zusammenhang zwischen dieser Missense- Mutation und dem Erscheinungsbild der angeborenen Samenleiteraplasie (Gervais et al., 1993) bestätigt. Ebenso die 5T- Längenreduktion des Polythymidintrakts im Intron 8 trat mit 12,2% mehr als doppelt so häufig auf Chromosom 7 der untersuchten CAVD- Patienten auf, als es die Heterozygotenfrequenz in der Allgemeinpopulation, die mit etwa 5% angegeben wird, erwarten ließ (Chu et al., 1993; Kiewewetter et al., 1993; Chillon et al., 1995; Zielenski et al., 1995). So konnte durch unsere Untersuchungen auch dieser Zusammenhang zwischen der Spleißvariante IVS8- 5T und dem Erscheinungsbild der angeborenen Samenleiteraplasie bekräftigt werden. Ein Screening allein für diese drei Mutationen hätte insgesamt schon 48,9% der Mutationen unserer CBAVD- Patienten erfasst. Vergleicht man die Allelfrequenzen unserer CBAVD- Patienten mit denen des von Dörk et al. untersuchten Patientenkollektivs, so lassen sich hier durchaus Parallelen ziehen, und zwar insofern, als dass das Auftreten der beiden CFTR- Mutationen $\Delta F508$ und R117H sowie der Spleißvariante IVS8- 5T eine Gemeinsamkeit aller untersuchten CBAVD- Patienten darstellt. Ergebnisse der Untersuchungen von Dörk et al. eignen sich besonders gut zum Vergleich mit unseren eigenen Ergebnissen, da seine wie auch unsere Patienten Großteils deutscher Herkunft sind.

3.1.2 CFTR- Mutationen bei Patienten mit kongenitaler unilateraler Samenleiteraplasie

Von den neun CUAVD Patienten unseres insgesamt 62 CAVD- Patienten umfassenden untersuchten Kollektivs war interessanterweise kein einziger von einer CFTR- Mutation betroffen. Eine Übersicht zum klinischen Lokalbefund sowie zum Nierenstatus der neun CUAVD- Patienten liefert Tabelle 11, in der zudem der Zeitpunkt der genetischen Untersuchung vermerkt ist- das zum jeweiligen Zeitpunkt untersuchte Mutationsspektrum kann der Tabelle 5, Punkt 2.6 Genetische Untersuchung, entnommen werden. Leider waren zwei unserer Patientenakten insofern unvollständig, als dass ein schriftlicher genetischer Befund fehlte und lediglich vom behandelnden Arzt handschriftlich vermerkt wurde, eine genetische Untersuchung auf Mutationen im CFTR- Gen hin sei ohne den Nachweis einer Mutation erfolgt.

Tabelle 11: Übersicht der CUAVD- Patienten

Patient	Klinischer Lokalbefund	Nierenstatus	Genetischer Befund
4	CUAVD rechts Sek.SL-Obstruktion links chronische Epididymitis links Hydrozele testis links	Nieren beidseits orthotop	(-/-) Dr. Ovens- Raeder 1995
7	CUAVD rechts Sek. SL-Obstruktion links Z.n. Herniotomie links	Nierenaplasie rechts	(-/-) Dr. Tettenborn, Ulm schriftlicher Befund fehlt
9	CUAVD links Zentraler SL-Verschluß rechts	Nierenaplasie links	(-/-) Dr. Ovens-Raeder 1996

26	CUAVD rechts Sek.SL-Obstruktion links Z.n. Orchidopexie links	Nierenaplasie rechts Beckenniere links	(-/-) Dr. Ovens-Raeder 1997
35	CUAVD links Zentraler SL-verschluß rechts	Nierenaplasie links	(-/-) Dr. Ovens-Raeder 1998
37	CUAVD links Varicozele links Sek. SL-Obstruktion rechts Z.n. Orchidopexie rechts	Nieren beidseits orthotop	(-/-) Dr. Ovens- Raeder 1995
41	CUAVD rechts NH-Obstruktion links	Nieren beidseits orthotop	(-/-) Dr. Ovens- Raeder 2001
49	CUAVD links Zentraler SL-Verschluß rechts	Nieren beidseits orthotop	(-/-) Dr. Ovens- Raeder 2000
51	CUAVD links Z.n. Orchidopexie links Z.n. Herniotomie beidseits Sek. SL-Verschluß rechts	Nierenaplasie links	(-/-) schriftlicher Befund fehlt

Sek.- Sekundär
SL- Samenleiter
Z.n.- Zustand nach

Auffällig erscheint die Häufung urogenitaler Fehlbildungen, Erkrankungen oder bereits erfolgter chirurgischer Eingriffe. Die unilaterale Samenleiteraplasie geht in fünf Fällen mit einer ipsilateralen Nierenaplasie einher, daneben sind weitere Strukturen wie Epididymis und Testes betroffen in Form von chronischen Epididymitiden, Varico- und Hydrozelen

oder einer Hodenatrophie. Außerdem wurden in drei Fällen Orchidopexien, in zwei Fällen Herniotomien durchgeführt. Von den fünf Patienten mit ipsilateraler Nierenaplasie wiesen vier Patienten weitere klinische Befunde im Urogenitalbereich auf, von den drei CUAVD- Patienten mit beidseits orthotop gelegenen Nieren einer. Der genetische Befund lieferte in keinem Fall einen Hinweis auf eine Beteiligung von CFTR- Mutationen an der Ätiologie der angeborenen einseitigen Samenleiteraplasie. Konnten bei den CBAVD- Patienten immerhin bei 38 von 53 Patienten Mutationen im CFTR- Gen nachgewiesen werden, so gelang dies bei keinem der neun CUAVD- Patienten. Zu beachten gilt natürlich, dass fünf der CUAVD- Patienten gleichzeitig von einer ipsilateralen Nierenaplasie betroffen sind, und die Samenleiteraplasie somit womöglich eher als Folge einer embryonalen Fehlentwicklung der diesseitigen urogenitalen Strukturen anzusehen ist und weniger als eine im Zusammenhang mit Mutationen im CFTR- Gen stehende CAVD. Natürlich kann das Vorhandensein etwaiger CFTR- Mutationen nie mit Sicherheit ausgeschlossen werden, gerade wenn man die teilweise noch frühen Zeitpunkte und eher wenig umfangreichen Mutationsspektren der untersuchenden genetischen Institute bedenkt.

3.2 Patienten mit kongenitaler Samenleiteraplasie ohne CFTR- Mutationen und ohne Nierenbeteiligung

Nicht nur all unsere CUAVD- Patienten, sondern auch fast ein Viertel der CBAVD- Patienten ohne Nierenbeteiligung blieben nach der genetischen Untersuchung ohne nachweisbare CFTR- Mutation. Um nun herauszufinden, ob unser Ergebnis auf ein zu wenig umfangreiches Routinespektrum zurückzuführen ist, folgt daher eine Tabelle von eben diesen Patienten, bei denen in der Routinediagnostik keine Mutationen im CFTR- Gen detektiert wurde, und zwar unter Angabe der Diagnose (CUAVD oder CBAVD) sowie des untersuchenden Instituts samt Zeitpunkt der genetischen Untersuchung und Anzahl der getesteten Mutationen. Die genaue Aufschlüsselung der einzelnen CFTR- Mutationen im jeweiligen Institut zum jeweiligen Zeitpunkt kann der Tabelle 5, Punkt 2.6 Genetische Untersuchung, entnommen werden. Die acht Patienten, die neben der

angeborenen Samenleiteraplasie gleichzeitig von einer einseitigen Nierenaplasie betroffen sind, blieben aus der Tabelle ausgenommen, eine Auflistung dieser Patienten findet sich unter Punkt 3.3, Patienten mit kongenitaler Samenleiteraplasie und Nierenbeteiligung, in dem insbesondere auf diese Gruppe eingegangen wird.

Tabelle 12: CAVD- Patienten ohne nachweisbare CFTR- Mutation und ohne Nierenbeteiligung

Patient	Diagnose	Herkunft	Institut	Zeitpunkt	∑ Mutationen
2	CBAVD	Deutsch	LMU	1994	7
4	CUAVD	Deutsch	Dr. Ov.-Raeder	1995	12
10	CBAVD	Deutsch	Dr. Ov.- Raeder	1995	12
19	CBAVD	Deutsch	Dr. Ov.- Raeder	1997	16
25	CBAVD	Deutsch	Dr. Ov.- Raeder	1997	16
29	CBAVD	Indonesisch	Dr. Ov.- Raeder	1997	16
34	CBAVD	Deutsch/ Jüd.	Dr. Ov.- Raeder	1998	35
36	CBAVD	Italienisch	LMU	1998	7
37	CUAVD	Deutsch	Dr. Ov.- Raeder	1995	12
41	CUAVD	Deutsch	Dr. Ov.- Raeder	2001	37
44	CBAVD	Türkisch	Dr. Ov.- Raeder	1999	22
46	CBAVD	Deutsch	Dr. Ov.- Raeder	1999	37
49	CBAVD	Deutsch	Dr. Ov.- Raeder	2000	37

57	CBAVD	Deutsch	Dr. Ov.- Raeder	2001	37
60	CBAVD	Deutsch	Dr. Ov.- Raeder	2001	37
62	CBAVD	Deutsch	Dr. Ov.- Raeder	2002	37

Σ: Summe der insgesamt getesteten Mutationen

Der genetische Befund von vierzehn der insgesamt 16 CAVD- Patienten ohne nachweisbare Mutation und ohne gleichzeitige Nierenbeteiligung wurde von Dr. Ovens-Raeder, Fachärztin für Humangenetik in München, erstellt, wobei die ersten Routineuntersuchungen von 1995 bis 1997 ein Spektrum von 12 beziehungsweise 15 CFTR- Mutationen umfassten. Die genetische Untersuchung der in dem Zeitraum von 1998 bis 2002 in Behandlung getretenen Patienten erfolgte mittels eines erweiterten, mittlerweile 35 bis 37 Mutationen umfassenden Programms. In allen Fällen, in denen es sich um Patienten deutscher Herkunft handelte, wurde die Detektionsrate von der untersuchenden Fachärztin für Humangenetik mit 85% angegeben, allerdings bezieht sich diese Wahrscheinlichkeit der Identifizierung von CFTR- Mutationen nicht auf CAVD-, sondern vielmehr auf CF- Patienten. Die Detektionswahrscheinlichkeit für Patienten mit angeborener Samenleiteraplasie beläuft sich wohl- selbst bei Ergänzung des Spektrums um die R117H- missense- Mutation und die IVS8-5T- Spleißvariante- nur auf etwa 52% der Allele aller CBAVD- Patienten entsprechend 56% der Allele von CBAVD- Patienten ohne Nierenbeteiligung (Stuhrmann et al., 1998). Für den Patienten türkischer Abstammung (44) wurde die Nachweischance mit etwa 33% angegeben, für den Patienten indonesischer Abstammung (29) konnte überhaupt keine Angabe zur Detektionswahrscheinlichkeit gemacht werden. Die Patienten 2 und 36, die 1994 beziehungsweise 1998 die genetischen Untersuchung am Institut für Humangenetik der LMU durchführen ließ, wurden auf ein geringeres Mutationsspektrum hin getestet: so umfasste das Routinespektrum 1994 gerade einmal sieben CFTR- Mutationen, wobei die CAVD- typische R117H sowie die Spleißvariante IVS8-5T nicht eingeschlossen waren. Und selbst vier Jahre später waren noch keine weiteren Mutationen zur CFTR- Diagnostik hinzugekommen. Insgesamt konnten bei 16 von 54 CAVD- Patienten ohne

Nierenbeteiligung keine Mutation im CFTR- Gen nachgewiesen werden, bei keinem der vier CUAVD- Patienten ohne Nierenbeteiligung ebenso wenig wie bei zwölf CBAVD- Patienten ohne Nierenbeteiligung. Ob sich der fehlende Nachweis einer womöglich doch vorhandenen Mutation mit der zu geringen Detektionswahrscheinlichkeit eines zu wenig umfangreichen Routineprogramms des untersuchenden genetischen Instituts erklären lässt oder ob tatsächlich keine Mutation im CFTR- Gen für die Genese der Samenleiterfehlanlage verantwortlich ist, kann insofern nicht beantwortet werden, als dass diese Studie retrospektiver Art ist und die teilnehmenden Patienten aufgrund fehlender Kooperation einer erneuten extensiven genetischen Untersuchung nicht zur Verfügung standen. Somit bleibt uns lediglich die zum jeweiligen Zeitpunkt erlangten Ergebnisse zu dokumentieren und unter Punkt 4, Diskussion, mit vorangegangenen Studien zu vergleichen und zu diskutieren.

3.3 Patienten mit kongenitaler Samenleiteraplasie und Nierenbeteiligung

Unser Ziel war es, neben Untersuchungen zur Bedeutung der Mutationen im CFTR- Gen für die 62 Patienten mit kongenitaler Samenleiteraplasie, gerade den CAVD- Patienten mit gleichzeitiger Nierenbeteiligung besondere Aufmerksamkeit zu schenken. Deshalb soll im Folgenden ganz spezieller Augenmerk auf diese Gruppe von Patienten gerichtet werden.

Diagnose	CBAVD	CUAVD rechts	CUAVD links	Insgesamt Σ
Nierenaplasie rechts	2 (Patient 48, 55)	2 (Patient 2, 26)	-	4
Nierenaplasie links	1 (Patient 23)	-	3 (Patient 9, 35, 51)	4
Insgesamt Σ	3	2	3	8

Die häufigste Diagnose wurde mit der unilateralen, linksseitigen Samenleiteraplasie mit ipsilateraler Nierenaplasie gestellt (Patient 9, 35 und 51). Ansonsten wurde jeweils zweimal eine einseitige linksseitige Samenleiteraplasie mit ipsilateraler Nierenaplasie (Patient 7, 26) als auch eine CBAVD mit rechtsseitiger Nierenfehlanlage (Patient 48, 55) diagnostiziert, in je einem Fall davon wiederum ist die überbleibende Niere dystop als Beckenniere angelegt (Patient 26, 55). Patient 23 ist von einer CBAVD mit linksseitiger Nierenaplasie betroffen. In der folgenden Tabelle 13 werden die Ergebnisse der genetischen Untersuchung sowie der familienanamnestischen Befragung aufgeführt.

Tabelle 13: CAVD- Patienten mit Nierenbeteiligung

Patient	Diagnose	Genetischer Befund	Familienanamnese
7	CUAVD rechts Nierenaplasie rechts	(-/-) liegt nicht schriftlich vor	Mutter, Schwester (Sohn und Tochter), 2 Cousins (Tochter/ Tochter und Sohn), Tochter: Nieren bds orthotop
9	CUAVD links Nierenaplasie links	(-/-) Dr.Ovens-Raeder, 02/1996	Großeltern und Eltern: Nieren bds orthotop Bruder (2 Töchter, 1 Sohn): kein sonographischer Befund
23	CBAVD Nierenaplasie links	(-/-) Dr.Ovens-Raeder, 05/1997	Keine Angabe möglich
26	CUAVD rechts Nierenaplasie rechts Beckenniere links	(-/-) Dr.Ovens-Raeder, 05/1997 (-/-) Humangenetisches Institut der Universität Göttingen 03/2003	Eltern, Cousine (Tochter): kein sonographischer Befund Tochter : Nieren bds orthotop, Sohn: links funktionslose Schrumpfniere aber bds

			Nierenanlage
35	CUAVD links Nierenaplasie links	(-/-) Dr.Ovens-Raeder 07/1998	Keine Angabe möglich
48	CBAVD Nierenaplasie rechts	(-/-) Dr.Ovens-Raeder 05/2000	Eltern, Schwester (2 Töchter), Zwillinge: Nieren bds orthotop
51	CUAVD links Nierenaplasie links	(-/-) Liegt nicht schriftlich vor	Eltern, Bruder: Nieren beidseits orthotop, 3 Kinder: nicht untersucht
55	CBAVD Nierenaplasie rechts Beckenniere links	(-/-) Humangenetisches Institut der Universität Ulm 11/1995	Eltern, Schwester mit Tochter und Sohn, 3 Brüder mit je 3,2,1 Tochter: Nieren beidseits orthotop

Die Familienanamnese wurde speziell bei unseren acht Patienten, die neben der Samenleiteraplasie auch noch von einer Nierenfehlanlage betroffen sind, durch erneute Kontaktaufnahme mit den Betroffenen zu ergänzen versucht. Insbesondere von Prof. Dr. med. Engel aus Göttingen kam der Impuls, diese acht CAVD- Patienten eindringlich nach dem Nierenstatus der näheren Verwandtschaft (ersten und zweiten Grades) zu befragen, um einen möglicherweise eigenen Erbgang für diese kombinierte Fehlbildung zu rekonstruieren. Diese Aufgabe zu bewerkstelligen sollte sich als schwieriger als erwartet herausstellen: Teilweise zeigten sich die Patienten äußerst unkooperativ, obwohl es sich lediglich um telefonische Auskünfte handelte. In zwei Fällen gelang nicht einmal die Kontaktaufnahme, einmal aufgrund eines Umzuges (der neue Aufenthaltsort des Patienten ließ sich weder über den behandelnden Hausarzt, den alten Arbeitsplatz noch die Telefonauskunft in Erfahrung bringen), einmal aufgrund heftiger Differenzen zwischen dem Patienten und den behandelnden Ärzten samt Pflegepersonal der Frauenklinik Dr. Krüsmann, die zu einem Abbruch der Behandlung und damit jeglichen

Kontakts führte. In den restlichen sechs Fällen wurden mehr oder weniger ausführlich Ergänzungen an der Familienanamnese vorgenommen, die allerdings lediglich auf den mündlichen Aussagen der Patienten beruhen. So weit wie möglich sollten diese Aussagen zwar auf sonographischen Befunden basieren, meist waren solche allerdings einfach noch nie erstellt worden. In allen Fällen lautete also das Resultat der oft mehrmaligen telefonischen Befragungen, dass keinerlei Hinweis auf eine Familiarität hinsichtlich der Nierenfehlanlagen besteht- keinem der CAVD- Patienten mit Nierenbeteiligung waren Besonderheiten bezüglich der Nieren seiner Verwandten bekannt. Einzig ein Fall einer Nierenfehlbildung trat bei dem Sohnes eines Betroffenen (Patient 26, Diagnose CUAVD, Nierenaplasie rechts, Beckenniere links) in Erscheinung, der zwar beidseitige Nierenanlagen aufwies, die linke Niere allerdings aufgrund Harnklappenverengungen zur funktionellen Schrumpfniere verkümmerte und mittlerweile entfernt wurde. Die molekulardiagnostische Untersuchung sechs der insgesamt acht CAVD- Patienten mit einseitiger Nierenaplasie (Patienten 9, 23, 26, 35, 48, 55) ergab in allen Fällen ein Fehlen jeglicher nachweisbaren Mutationen im CFTR- Gen. Die restlichen zwei Patienten mit kongenitaler Samenleiter- und gleichzeitiger Nierenaplasie können allerdings aufgrund fehlender schriftlicher Dokumentation des genetischen Befundes durch das untersuchende Institut nicht in die Tabelle integriert werden, auch wenn laut handschriftlichem Vermerk des behandelnden Urologen eine genetische Untersuchung erfolgt war, und zwar ohne den Nachweis einer Mutation auf dem CFTR- Gen (Patient 7, 51).

Ob der fehlende Nachweis einer CFTR- Mutation womöglich auf ein zu wenig umfangreiches Mutationsspektrum zurückzuführen ist, soll die nächste Tabelle verdeutlichen, die das untersuchte Mutationsspektrum in Abhängigkeit von Institut und jeweiligem Zeitpunkt der Untersuchung darstellt. Immerhin waren mindestens die elf häufigsten CFTR- Mutationen, in allen Fällen die Mutationen dF508 und R117H sowie die IVS8-5T- Spleißvariante Bestandteil der Routineprogramme.

Tabelle 14: Mutationsspektren der genetischen Untersuchung der CAVD- Patienten mit Nierenbeteiligung

--	--

<p>Patient 9: (-/-) Dr. Ovens- Raeder, 1996</p>	<p>dF508, R117H, dI507, G542X, G551D, R553X, R347P, W1282X, N1303K, 1717-1G>A, 3849+10kbC>T, IVS8- 5T</p>
<p>Patient 23: (-/-) Dr. Ovens- Raeder, 1997</p>	<p>dF508, R117H, dI507, G542X, G551D, R553X, R347P, W1282X, N1303K, 1717-1G>A, 3849+10kbC>T, 3272-26A>G, 2143delT, Y1092X, R334W, IVS8- 5T</p>
<p>Patient 26: (-/-) Dr. Ovens- Raeder, 1997 Humangenetisches Institut der Universität Göttingen, 2003</p>	<p>dF508, R117H, dI507, G542X, G551D, R553X, R347P, W1282X, N1303K, 1717-1G>A, 3849+10kbC>T, 3272-26A>G, 2143delT, Y1092X, R334W, IVS8- 5 dF508, R117H, R347P, dI507, 1677delTA, 1717- 1G>A, G542X, S549RA>C, S549RT>G, S549N, S549I, G551S, G551D, 1784delG, R553Q, R553X, R560T, 3849+10kbC>T, W1282X, N1303K, IVS8- 5T</p>
<p>Patient 35: (-/-) Dr. Ovens- Raeder, 1998</p>	<p>dF508, R117H, dI507, G542X, G551D, R553X, R347P, W1282X, N1303K, 1717-1G>A, 3849+10kbC>T, 3272-26A>G, 2143delT, Y1092X, R334W, G85E, 621+G>T, Y122X, 711+G>T, 1078delT, R347H, A445E, Q493X, V520F, 1677delTA, R560T, S549R, S549N, 2183AA>G, 2789+5G>A, 3849+4A>G, R1162X, 3659delC, 3905insT, IVS8- 5T</p>
<p>Patient 48: (-/-) Dr. Ovens- Raeder, 2000</p>	<p>dF508, R117H, dI507, G542X, G551D, R553X, R347P, W1282X, N1303K, 1717-1G>A, 3849+10kbC>T, 3272-26A>G, 2143delT, Y1092X, R334W, G85E, 621+G>T, Y122X, 711+G>T, 1078delT, R347H, A445E, Q493X, V520F, 1677delTA, R560T, S549R, S549N, 2183AA>G, 2789+5G>A, 3849+4A>G, R1162X, 3659delC, 3905insT, E60X, S1251N, IVS8- 5T</p>
<p>Patient 55: (-/-)</p>	<p>dF508, R117H, R347, dI507, 1717-1G>A, G542X,</p>

Humangenetisches Institut der Universität Ulm, 1995	G551D, R553X, W1282X, N1303K, IVS8-5T
--	---------------------------------------

Die genetischen Untersuchungen der acht CAVD- Patienten mit Nierenbeteiligung ergaben keinen Hinweis auf das Vorhandensein von Mutationen im CFTR- Gen. In der Literatur wurde bereits mehrfach auf eine mögliche Unabhängigkeit der kongenitalen Samenleiteraplasie von CFTR- Mutationen im Falle einer gleichzeitigen Nierenaplasie hingewiesen. Die Ätiologie dieser kombinierten Fehlbildung wurde mit der embryologischen Fehlentwicklung urogenitaler Strukturen wie Samenleiter, Samenbläschen, Nebenhoden und der Niere aus dem gesamten diesseitigen mesonephrischen Gangs versucht zu erklären, der Zeitpunkt dafür ist wohl vor der sechsten Schwangerschaftswoche anzusetzen, noch bevor sich der Wolff- Gang von der Ureterknospe trennt. Oftmals treten im Falle einer angeborenen Samenleiteraplasie weitere urogenitale Anomalien auf, da eine Funktionsstörung in der Entwicklung der urogenitalen Strukturen aus dem Wolff- Gang neben der Samenleiteraplasie weitere Konsequenzen haben kann: die Samenbläschen beispielsweise sind in den meisten Fällen hypo- oder gar dysplastisch, ebenso wie der Nebenhoden, der in vielen Fällen - abgesehen vom Nebenhodenkopf- nicht ausgebildet ist. Ausserdem fiel bei den von uns untersuchten CAVD- Patienten mit Nierenaplasie ein gehäuftes Vorkommen von weiteren urologischen Besonderheiten auf, die in der folgenden Tabelle erfasst wurden.

Tabelle 15: Klinischer Befund von CAVD- Patienten mit Nierenbeteiligung

Patient	Diagnose	Klinische Besonderheiten
7	CUAVD rechts Nierenaplasie rechts	Z. n. Herniotomie rechts
23	CBAVD Nierenaplasie links	Kryptorchismus links
26	CUAVD rechts Nierenaplasie rechts	Beckenniere links Z. n. Orchidopexie links

35	CUAVD links Nierenaplasie links	Hodenatrophie rechts
51	CUAVD links Nierenaplasie links	Z. n. Herniotomie beidseits Z. n. Orchidopexie links
55	CBAVD Nierenaplasie rechts	Beckenniere links

In zwei Fällen liegt neben der rechtsseitigen Nierenaplasie kontralateral eine Beckenniere vor (Patient 26, 55). Bei zwei Patienten wurde noch im Säuglingsalter Herniotomien angeborener indirekter Inguinalhernien mit dem nicht obliterierten Processus vaginalis peritonei als Bruchsack durchgeführt, einmal beidseits (Patient 51), einmal rechtsseitig (Patient 7). Nach Verschluss am inneren Leistenring wurde der Bruchsack abgetragen; ob es dabei in der Inguinalregion nicht leicht zur Verletzung von gerade in diesem frühen Alter noch so zarten Strukturen wie dem Samenstrang kommt, ist fraglich. Denn möglicherweise hatte die im Säuglingsalter durchgeführten Herniotomie bei Patienten 51 einen sekundär verschlossenen weil bei der Operation verletzten und daraufhin vernarbten, primär eigentlich aber angelegten rechten Samenleiter zur Folge. Auch Orchidopexien nach Hodentorsionen mussten in zwei Fällen durchgeführt werden (Patienten 26, 51), außerdem fand sich, nachgewiesen durch CT-Aufnahmen, bei Patient 25 ein aufgrund eines Maldescensus testis atrophierte Leistenhoden. Eine Hodenatrophie trotz orthotoper Lage desselben wurde bei Patienten 35 diagnostiziert.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass insgesamt sechs von acht CAVD- Patienten mit Nierenbeteiligung entweder bereits chirurgisch- urologische Eingriffe vornehmen lassen mussten oder andere urogenitale Anomalien aufwiesen. Unterscheidet man hierbei noch zwischen Patienten die von einer kongenitalen unilateralen beziehungsweise bilateralen Samenleiteraplasie betroffen waren, so ergibt sich ein Verhältnis von vier CUAVD- Patienten gegenüber zwei CBAVD- Patienten mit weiteren urogenitalen Besonderheiten. Auch was eine gleichzeitige Nierenbeteiligung angeht hatten die CUAVD- Patienten daran größeren Anteil als die CBAVD- Patienten. Den Zusammenhang zwischen dem ein- oder beidseitigen Auftreten der

Samenleiterfehlanlage und der Nierenaplasie bei unseren Patienten verdeutlicht die folgende Übersicht:

	CUAVD- Patienten	CBAVD- Patienten
Patienten mit Nierenaplasie	5 (55,6%)	3 (5,6%)
Patienten ohne Nierenaplasie	4 (44,4%)	50 (94,4%)

Von den insgesamt acht Patienten mit Nierenbeteiligung zählen fünf Patienten zur Gruppe der CUAVD und drei Patienten zur Gruppe der CBAVD, wobei die Gruppe der CBAVD- Patienten ganze 53 Patienten, die der CUAVD nur neun Patienten umfasst. Somit ergibt sich für die CUAVD- Patienten ein relativer Anteil von 55,6% mit Nierenbeteiligung (fünf aus neun), für die CBAVD- Patienten ein um das Zehnfache geringerer relativer Anteil von nur 5,6% (drei aus 53). Berücksichtigt man nun den Nachweis von CFTR- Mutationen, so bleibt der Anteil der CUAVD- Patienten ohne CFTR- Mutationen mit Nierenbeteiligung gleich, da keiner der neun CUAVD- Patienten eine Mutation im CFTR- Gen aufweist. Von den 53 CBAVD- Patienten sind allerdings insgesamt 38 Patienten (71,6%) Träger von CFTR- Mutationen, davon 20 (34,0%) in homozygotem oder compound- heterozygotem, bei den restlichen 18 (37,7%) in heterozygotem Zustand. Verbleiben also 15 CBAVD- Patienten ohne nachweisbare CFTR- Mutationen, der Anteil der CBAVD- Patienten mit Nierenbeteiligung (drei Patienten) an der Gruppe der CBAVD- Patienten ohne nachweisbare CFTR- Mutation (15 Patienten) beträgt somit 20%.

4. Diskussion

In diesem letzten Teil der Arbeit zum Thema Untersuchungen zur Bedeutung der Mutationen im CFTR- Gen bei Patienten mit kongenitaler Samenleiteraplasie unter besonderer Berücksichtigung der Nierenaplasie geht es darum, die erlangten Ergebnisse zu hinterfragen und zu diskutieren. Dies wird erleichtert, indem man vorangegangene Studien zum Vergleich heranzieht um Gemeinsamkeiten, aber auch Unterschiede hervorzuheben. Die folgende Übersicht fasst die Befunde unseres untersuchten Patientenkollektivs von insgesamt 62 CAVD- Patienten zusammen, die nachfolgend diskutiert werden sollen.

	Patienten mit Nierenbeteiligung	Patienten ohne Nierenbeteiligung	Insgesamt Σ
CUAVD- Patienten (ohne CFTR- Mutation)	5	4	9
CBAVD- Patienten (ohne CFTR- Mutation)	3	12	15
CBAVD- Patienten (eine CFTR- Mutation)	-	18	18
CBAVD- Patienten (zwei CFTR- Mutationen)	-	20	20
Insgesamt	8	54	62

4.1 Patienten mit kongentialer Samenleiteraplasie und Mutationen im CFTR- Gen

Wir konnten bei 20 CBAVD- Patienten zwei Mutationen, die in vier Fällen homozygot, in 16 Fällen compound- heterozygot vorliegen und bei 18 Patienten eine im heterozygotem Zustand vorliegende Mutation im CFTR- Gen nachweisen. Häufigster nachweisbarer Genotyp dabei stellt der Basenaustausch dF508 im heterozygoten Zustand dar, gefolgt von der compound- Heterozygotie dieser Mutation kombiniert mit der missense- Mutation R117H beziehungsweise mit der Spleißvariante IVS8-5T. Dörk et al. gelangen zu einem ähnlichen Ergebnis: bei Untersuchungen an 106 CBAVD- Patienten deutscher Herkunft erwies sich die Kombination dF508/ R117H als der häufigste, bei jedem fünften Patienten auftretende Genotyp (Dörk et al., 1997).

Die bei unseren CAVD- Patienten am häufigsten nachgewiesene CFTR- Mutation stellt der dF508 Basenaustausch dar. 29 unserer insgesamt 62 CAVD- Patienten (46,8%) waren Träger der dF508- Mutation, berechnet man darunter den Anteil an CBAVD- Patienten (53) ergibt sich sogar eine Allelfrequenz von 54,7%. Allerdings handelt es sich bei vier unserer Patienten um an einer mild ausgeprägten Form der Mukoviszidose Erkrankte, weshalb streng genommen von einer Allelfrequenz für die dF508- Mutation bei „nur“ - CBAVD- Patienten (49) von 51,0% ausgegangen werden muss. In Untersuchungen von Attardo et al. wurde ebenfalls bei über der Hälfte (55,6%) der sizilianischen CBAVD- Patienten mit nachgewiesener Mutation im CFTR- Gen die dF508- Mutation detektiert (Attardo et al., 2001). Mercier et al. untersuchten das Genom von CBAVD- Patienten aus Frankreich, Belgien, Italien und den USA und konnten bei 41,8% der Patienten die dF508- Mutation nachweisen (Mercier et al. 1995). In der spanischen Bevölkerung gilt ebenfalls die dF508- Mutation mit 43% als die am häufigsten detektierte CFTR- Mutation bei CAVD- Patienten. Danach folgen, was die Häufigkeit des Auftretens angeht, die G542X- und die L206W- Mutation mit 6% beziehungsweise 4% noch vor der, in der deutschen Population besonders mit der CBAVD- assoziierten Klasse 4- Mutation R117H mit 3,6% (Casals et al., 2000), die mit 17,7% die zweithäufigste Mutation im Genom unserer 62 CAVD- Patienten darstellt-

berechnet für die CBAVD- Patienten ergibt sich eine Allelfrequenz von 20,8%. Die Erkenntnis, dass relativ viele Betroffene einer CBAVD compound- heterozygote Träger dieser Klasse 4- Mutation sind (Bienvenu et al., 1993; Gervais et al., 1993; Williams et al., 1993) führte dazu, das Routinespektrum für CFTR- Mutationen bei der genetischen Untersuchung von CAVD- Patienten um die R117H- missense- Mutation zu erweitern. Auch Dörk et al. errechneten für diese Mutation eine Häufigkeit von 22,6% der CAVD- Patienten überwiegend deutscher Herkunft (Dörk et al., 1997), wohingegen Attardo et al. diese Mutation kein einziges Mal in ihrem Kollektiv sizilianischer CBAVD- Patienten nachweisen konnten (Attardo et al., 2001), Mercier et al. bei immerhin 9,0% der Patienten (Mercier et al., 1995). Diese CAVD- assoziierte Klasse 4- Mutation scheint starken regionalen Schwankungen zu unterliegen, offensichtlich typisch für CFTR- Mutationen: so wurde die Klasse 1- Mutation W1282X, die beispielsweise bei jüdischen CF- Patienten (Ashkenazim- Juden) eine Frequenz von 47,9%, bei jüdischen Tunesiern von 17,4% (Kerem et al., 1995) und bei CF- Patienten aus dem Libanon eine Frequenz von 16,7% (Desgeorges et al., 1997) aufweist, bei 10,8% der sizilianischen CBAVD- Patienten (Attardo et al, 2001), bei 7,5% der CBAVD- Patienten aus Merciers Kollektiv (Mercier et al, 1995), aber nur bei einem einzigen unserer CBAVD- Patienten (1,9%) und bei keinem der CBAVD- Patienten spanischer Herkunft, die Casals et al. untersuchten (Casals et al, 2000), nachgewiesen. Nur der IVS8-5T- Längenpolymorphismus scheint mit einer Beteiligung von 23% an den nachgewiesenen Mutationen und Varianten der spanischen (Casals et al., 2000) und 44% der sizilianischen (Attardo et al, 2001) CBAVD- Patienten gleichermaßen dort wie auch in der deutschen Population (22,6%, unsere Ergebnisse) bedeutsam hinsichtlich des Krankheitsbilds der kongenitalen Samenleiterfehlanlage. Das Wissen um die Mutationsverteilung in der jeweiligen Population, der der zu untersuchende CAVD- Patient entstammt, sollte daher offensichtlich vom durchführenden genetischen Institut ganz besonders berücksichtigt werden.

4.2 Patienten mit kongenitaler Samenleiteraplasie ohne Mutation im CFTR- Gen

Immerhin 24 der Patienten unseres insgesamt 62 CAVD- Patienten umfassenden Kollektivs blieben ohne nachweisbare Mutation im CFTR- Gen, davon alle Patienten mit unilateraler Samenleiteraplasie (neun Patienten) sowie alle CAVD- Patienten, die gleichzeitig von einer Nierenaplasie betroffen sind (insgesamt acht Patienten, davon fünf CUAVD- und drei CBAVD- Patienten) und zwölf CBAVD- Patienten ohne Nierenaplasie und ohne nachweisbare CFTR- Mutation.

Wir können lediglich Vermutungen anstellen, in welchen Fällen eine CFTR- Mutation gar nicht zu erwarten gewesen wäre- eventuell bei den CUAVD- Patienten mit iatrogen bedingtem Verschluss des kontralateralen Vas deferens- und in welchen Fällen eine vorhandene Mutation wahrscheinlich nicht detektiert wurde- beispielsweise bei Patient 29 indonesischer Abstammung, in der das CAVD- verursachende CFTR- Mutationsspektrum möglicherweise ein ganz anderes ist als bei CAVD- Patienten deutscher Herkunft. Außerdem wurde der italienischen Herkunft von Patient 36 und der sich daraus ergebenden Konsequenzen hinsichtlich des Mutationsspektrums keine besondere Aufmerksamkeit geschenkt, da die bei sizilianischen CAVD- Patienten nach der dF508- zweithäufigste W1282X- Mutation (Attardo et al., 2001) gar nicht untersucht wurde. Aber nicht nur die Auswahl an getesteten Mutationen, auch die Anzahl kann entscheidend sein: die Patienten 2, 10, 36 und 37 wurden lediglich auf sieben bis zwölf CFTR- Mutationen hin getestet, wobei das vom genetischen Institut der LMU untersuchte Routinespektrum nicht einmal die bewiesenermaßen mit der CAVD- assoziierte R117H- missense- Mutation oder die IVS8-5T- Spleißvariante einschließt. Im Folgenden soll die von uns erlangte Nachweiswahrscheinlichkeit der CFTR- Mutationen bei Patienten mit kongenitaler Aplasie des Vas deferens verglichen und diskutiert werden.

4.3. Nachweiswahrscheinlichkeit für CFTR- Mutationen

Zusammengefasst konnten in den Jahren 1994 bis 2002 von insgesamt 62 CAVD-Patienten mittels genetischer Routineuntersuchungen, die Mutationsspektren von mindestens sieben bis maximal 37 CFTR- Mutationen umfassten, bei 20 Patienten (32,3%) zwei Mutationen nachgewiesen werden, darunter allerdings auch die vier an einer mild ausgeprägten Mukoviszidose- Erkrankten. Zum Vergleich unserer Ergebnisse mit denen vorangegangener Studien folgt Tabelle 16.

Tabelle 16: CFTR- Genotypen bei 318 CBAVD- Patienten

Genotyp	Chillon [102]	Costes [45]	Zielenski [70]	Dörk [101]	Σ [318]
homozygot / compound heterozygot	54 (53%)	36 (80%)	41 (59%)	75 (74%)	206 (64%)
heterozygot	26 (26%)	6 (14%)	14 (20%)	11 (10%)	56 (17%)
kein Mutations- nachweis	22 (22%)	3 (7%)	15 (21%)	16 (16%)	56 (18%)

Aufgelistet sind Studien, in denen jeweils das gesamte Gen (alle 27 Exons) auf Mutationen (inklusive IVS8- 5T) untersucht wurden (Chillon et al., 1995; Costes et al., 1995; Zielinski et al., 1995; Dörk et al., 1997)

Tabelle 17: CFTR- Genotypen unserer 62 CAVD- Patienten

Genotyp	CAVD- Patienten [62]	CBAVD- Patienten ohne Nierenaplasie [50]
homozygot/ compound- heterozygot	20 (32,2%)	20 (40,0%)
heterozygot	18 (29,0%)	18 (36,0%)
kein Mutationsnachweis	24 (38,7%)	12 (24,0%)

Chillon et al. können bei 54%, Zielinski et al. bei 59%, Dörk et al. bei 75% und Costes et al. gar bei 80% ihrer CBAVD- Patienten zwei CFTR- Mutationen detektieren, wobei Costes die CBAVD- Patienten mit Nierenbeteiligung aus seiner Statistik ausschließt (Chillon et al., 1995; Zielinski et al., 1995; Dörk et al., 1997; Costes et al., 1995). Aber selbst wenn wir nur von unseren 50 Patienten mit bilateraler kongenitaler Samenleiteraplasie und ohne Nierenbeteiligung ausgehen, erlangen wir lediglich für 40% der Betroffenen einen Nachweis von zwei Mutationen.

Eine Heterozygotie für CFTR- Mutationen wurde bei 18 CAVD- Patienten (29,0%) durch die genetische Routineuntersuchung festgestellt, was wiederum bezogen auf die 50 CBAVD- Patienten ohne Nierenbeteiligung einen relativen Anteil von 36% ergibt. Vorangegangene Studien geben diesen Anteil mit 26% (Chillon et al., 1995), 20% (Zielinski et al., 1995), 14 % (Costes et al., 1995) oder gar nur 10% (Dörk et al., 1997) an. Bei insgesamt 15 unserer CBAVD- Patienten (24,2%) und zusätzlich allen neun CUAVD- Patienten (14,5%) gelang kein Nachweis einer CFTR- Mutation (der schriftliche Befund des genetischen Instituts von zwei CAVD- Patienten mit unilateraler Nierenaplasie fehlte, laut handschriftlichen Vermerk des behandelnden Arztes konnte aber im Routineprogramm keine CFTR- Mutation nachgewiesen werden). Selbst wenn man die acht Patienten, die neben einer Samenleiterfehlanlage auch von einer

Nierenaplasie betroffen sind, von unserem insgesamt 62 CAVD- Patienten umfassenden Kollektiv abzieht, da ein Zusammenhang dieser Form der CAVD mit CFTR- Mutationen noch diskutiert wird, verbleiben immerhin sechzehn von insgesamt 62 Patienten (25,8%) ohne nachweisbare Mutation. Auffällig scheint die Tatsache, dass keiner unserer neun CUAVD- Patienten Träger einer CFTR- Mutation ist, obwohl Mickle et al. bereits nachweisen konnten, dass die Genese der kongenitalen unilateralen Samenleiteraplasie- bei undurchgängigem kontralateralem vas deferens, wie es bei all unseren CUAVD- Patienten der Fall war- durchaus auch auf Mutationen im CFTR- Gen zurückgeführt werden kann (Mickle et al., 1995). Oder auch der Grund dafür, warum bei den restlichen zwölf Patienten mit beidseitiger Samenleiteraplasie ohne Nierenbeteiligung keine CFTR- Mutationen nachgewiesen werden kann, kann wohl nicht eindeutig geklärt werden, sondern vielmehr lediglich versucht werden, verschiedene in Frage kommende Möglichkeiten aufzuzeigen, wie beispielsweise das unterschiedliche Spektrum der untersuchten CFTR- Mutationen.

4.3.1 Spektrum der untersuchten CFTR- Mutationen

Sicherlich spielt das im Routineprogramm des jeweils untersuchenden genetischen Instituts eingesetzte Mutationsspektrum eine Rolle für das Erzielen einer möglichst hohen Detektionsrate. Je mehr CFTR- Mutationen bei der genetischen Untersuchung getestet werden, um so größer ist natürlich die Wahrscheinlichkeit, vorhandene Mutationen zu detektieren. Aber: warum erbringen Wang et al. trotz umfassender Analyse von Chromosom 7 nur bei knapp 36% der CAVD- Patienten den Nachweis zweier CFTR- Mutationen (Wang et al., 2002)? Natürlich kommt es bei der genetischen Untersuchung auf die Auswahl der zu testenden Mutationen an- so können mit einem Untersuchungsprogramm, das gewöhnlich die in Tabelle 2 (Punkt 1.4, Mutationen im CFTR- Gen) aufgeführten CFTR- Mutationen umfasst, die in Deutschland eine Allelfrequenz von etwa 1% der krankheitsassoziierten Genveränderungen erreichen oder überschreiten, nur etwa 85% der krankheitsverursachenden Mutationen deutscher CF- Patienten erfasst werden. Anders ausgedrückt bedeutet dies, dass bei nur circa 72% der deutschen CF- Patienten die krankheitsverursachende Genveränderung auf beiden Chromosomen 7 nachgewiesen werden kann, sich bei 26% der Mukoviszidose-

Betroffenen eine, bei etwa 2% gar keine CFTR- Mutation finden lässt (Stuhrmann et al., 1998). Bekanntermaßen stellt sich die molekulargenetische Diagnostik der CAVD komplexer als die der typischen Mukoviszidose dar, da hierfür neben den typischen CF- Mutationen wohl weitere Mutationen verantwortlich sind, die im üblichen „Routineprogramm“ nicht enthalten sind. Selbst wenn zusätzlich zu den häufigsten „CF- Mutationen“ noch die beiden häufigsten „CAVD- Mutationen“ R117H und IVS8-5T Bestandteil der genetischen Untersuchung sind, lassen sich somit nur auf circa 52% aller CAVD- Allele beziehungsweise auf 56% der Allele von CBAVD- Patienten ohne Nierenbeteiligung nachweisen (Dörk et al., 1997).

In unserem Fall waren natürlich sowohl der Zeitpunkt der genetischen Untersuchung unserer Patienten als auch das durchführende Institut begrenzende Faktoren, was das im einzelnen Falle getestete Mutationsspektrum anbelangt. So wurden die ersten in unserer Studie erfassten Patienten im Zeitraum zwischen 1994 und 1996 auf weniger CFTR- Mutationen hin untersucht als die Letzten, für die dann ab 2000 bereits ein erweitertes Mutationsspektrum bereitstand. Außerdem gelang es mancherorts schneller, die Routineprogramme zur Untersuchung des CFTR- Gens zu aktualisieren und um neu detektierte oder neu in Zusammenhang mit der kongenitalen Samenleiteraplasie gebrachte CFTR- Mutationen zu erweitern. Tabelle 5, Punkt 2.6 Genetische Untersuchung, gibt Aufschluss über die vom jeweiligen genetischen Institut zum entsprechenden Zeitpunkt getesteten CFTR- Mutationen. Nachzuweisen, ob sich nun aber ein Zusammenhang zwischen der Anzahl an untersuchten und dem Nachweis von compound- heterozygot oder heterozygot vorliegenden Mutationen bei unseren CBAVD- Patienten erkennen ließe, ist in unserem Fall unmöglich, denn: Wurden bei unseren Patienten mit kongenitaler Samenleiteraplasie zwei Mutationen im CFTR- Gen nachgewiesen, so handelte es sich natürlich immer um solche, die Bestandteil der Mutationsspektren der Routineprogramme zur CFTR- Diagnostik waren. In allen 20 Fällen war ein Allel vom dF508- Basenaustausch, in acht Fällen das homologe Allel von der missense- Mutation R117H beziehungsweise in sieben Fällen von der IVS8-5T- Spleißvariante betroffen. Zweimal konnte die 3272-26A>G, einmal die L1388Q- Mutation nachgewiesen werden, allesamt relativ häufige Mutationen, die schon seit längerem zur Routinediagnostik bei CAVD- Patienten zählen. Einzig die Tatsache, dass wir mit der Auswertung der uns zur Verfügung gestellten Daten und Befunde Ergebnisse erzielen,

die hinsichtlich der Nachweiswahrscheinlichkeit der CFTR- Mutationen im Genom unserer CAVD- Patienten relativ schlecht abschneiden im Vergleich mit vorangegangenen Studien, legt den Verdacht nahe, dass aufgrund teilweise noch sehr begrenzter Mutationsspektren gerade in den Anfängen unserer Untersuchung (1994-1996) viele seltenere CFTR- Mutationen übersehen wurden. Betrachtet man allerdings die in Tabelle 12, Punkt 3.2 Patienten mit kongenitaler Samenleiteraplasie ohne CFTR- Mutationen und ohne Nierenbeteiligung, in der CAVD- Patienten ohne nachweisbare CFTR- Mutationen aufgelistet sind samt Ort und Zeitpunkt der genetischen Untersuchung und auch der Anzahl an untersuchten CFTR- Mutationen, so wird deutlich, dass nicht wirklich ein Zusammenhang zwischen einem fehlenden Nachweis von und der Anzahl an getesteten CFTR- Mutationen zu erkennen ist. Zwei dieser Patienten hatten ein mit nur sieben zu untersuchenden CFTR- Mutationen recht enges Mutationsspektrum an zu testenden Mutationen, drei Patienten wurden auf zwölf, drei auf 16 und einer auf 22 CFTR- Mutationen hin untersucht. Die restlichen sieben CAVD- Patienten durchliefen bei der Suche nach der Samenleiteraplasie zugrundeliegenden Mutationen ein Routineprogramm, das die 35 bis 37 häufigsten CFTR- Mutationen einschließt. Der Umfang des untersuchten Mutationsspektrum alleine kann wohl nicht für den fehlenden Nachweis der CFTR- Mutationen der CAVD- Patienten verantwortlich gemacht werden. Es existieren nämlich auch Studien, deren Ergebnisse durchaus mit unseren vergleichbar sind, und zwar trotz umfassender genetischer Untersuchung der CAVD- Patienten. Wang et al., die mittels Massenspektrometrie 92 CBAVD- Patienten auf insgesamt 100 CFTR- Mutationen hin untersuchten, konnten nur bei 35,9% zwei Mutationen nachweisen, die in 94% in compound- heterozygoter Form vorlagen (Wang et al., 2002). Attardo et al. konnten bei 48% lediglich eine typische CFTR- Mutation detektieren, in nur 16% lag daneben noch die IVS8-5T Spleißvariante vor (Attardo et al., 2001). Und Mercier et al. konnten bei 67 untersuchten CAVD- Patienten nur in 24% der Fälle compound- heterozygot und in 42% heterozygot nachweisen vorliegende CFTR- Mutationen, obwohl er mit insgesamt 37 Primern alle 27 Exons samt den Intron/ Exon-Übergängen durchforstete (Mercier et al., 1995). Eine interessante Studie zu diesem Thema führten Mak et al. durch: Sie analysierten die 31 häufigsten CFTR- Mutationen bei 64 CBAVD- Patienten und erreichten damit eine Allelfrequenz von 30,5%. Anschließend führten sie eine allelspezifische Oligonukleotid- Hybridisation zur

Längenbestimmung des Polypyrimidin- Trakts sowie ein Screening aller Exons durch direkte DNA- Sequenzierung durch. Damit wollten sie seltenere oder noch unbekannte CFTR- Mutationen detektieren und die Nachweiswahrscheinlichkeit für CFTR- Mutationen bei CBAVD- Patienten steigern. Dies gelang auch insofern, als dass nun auf 72 von 126 Allelen eine Mutation nachweisbar war (57%), allerdings handelte es sich von 33 neu nachgewiesenen betroffenen Allelen bei 25 um den Nachweis der Spleißvariante IVS8-5T, nur acht der 33 neu nachgewiesenen mutierten Allele trugen eine seltene oder noch unbekannte CFTR- Mutation (Mak et al., 1999). Die Spleißvariante IVS8-5T ist in Deutschland seit längerem fester Bestandteil des Routineprogramms zur CFTR- Diagnostik, weitere acht mutierte Allele konnten wirklich identifiziert werden mit Hilfe einer extensiven Suche nach CFTR- Mutationen, was einer Steigerung der Detektionsrate um 6,3% entspricht. Bezogen auf die überhaupt detektierten Mutationen machen diese acht „Neulinge“ sogar ganze 17% aus. Ergebnisse, denen durchaus Beachtung geschenkt werden sollte, gerade wenn es um die Festlegung und Begrenzung von Mutationsspektren für genetische Routineuntersuchungen geht.

Die Aufwendigkeit der Untersuchungsmethoden und die damit verbundenen Kosten stellen durchaus begrenzende Faktoren dar, die Entwicklung neuer Technologien wie der Chip- Technologien (Ginot, 1997) oder die für die Diagnostik genetischer Veränderungen angepasste Anwendung bekannter Verfahren wie das der Massenspektrometrie (Braun et al., 1997) werden jedoch dazu führen, dass sich die routinemäßige molekulargenetische Diagnostik in den nächsten Jahren erweitern wird. Insgesamt können heutzutage durch die Routinediagnostik mit einem schon in den letzten Jahren stetig erweiterten Mutationsspektrum nur auf etwa 52% aller CAVD- Allele beziehungsweise auf 56% der Allele von CAVD- Patienten ohne Nierenbeteiligung mutiert vorliegende Allele nachgewiesen werden (Dörk et al., 1997). Mit dem Verfahren einer SSCP- Analyse (single- stranded- conformation- polymorphism, Orita et al., 1989; Chillon et al., 1994) oder einer DGGE- denaturing gradient gel elektrophoresis (Myers et al., 1985; Costes et al., 1995) stehen weiterführende Testmethoden zur Verfügung, mit denen alle 27 Exons des CFTR- Gens untersucht und die Detektionsraten auf krankheitsverursachende Mutationen auf 95,4% (Dörk et al., 1994) beziehungsweise 97% bei CF- Patienten (Casals et al., 2000) und auf 79% (Dörk et al., 1997)

beziehungsweise 85% aller CAVD- Patienten (Casals et al., 2000) verbessert werden können. Derartige Untersuchungen sind aber derzeit sehr kosten - und zeitintensiv und damit für eine Routinediagnostik nicht praktikabel. Ein Referenzzentrum wie beispielsweise in England (Dr. Super, Manchester) an das sämtliche Diagnostik- Labors zur Klärung von Verdachtsfällen ihre mit eigenen Mitteln nicht aufgeklärten DNA- Proben weiterleiten können, wobei die Kosten dafür vom öffentlichen Gesundheitswesen gedeckt werden, existiert in Deutschland leider nicht, wäre aber in jedem Falle sehr begrüßenswert. Andererseits wurde die uns von Prof. Engel, Genetisches Institut der Universität Göttingen, angebotene Unterstützung im Sinne einer nochmaligen erweiterten genetischen Untersuchung des Chromosoms 7 auf CFTR- Mutationen hin von nur einem der CAVD- Patienten mit bislang negativem genetischen Befund wahrgenommen. Der angeblich zu große Aufwand einer dafür benötigten Blutabnahme wurde meist als Argument dafür angeführt, das Angebot einer nochmaligen, genaueren genetische Untersuchung auszuschlagen. Im Hintergrund steht eventuell die Besorgnis der Patienten, durch diese extensive Suche nach Mutationen im CFTR- Gen tatsächlich eine solche ausfindig zu machen und im Nachhinein doch noch als Träger einer Mutation im Genom identifiziert zu werden, obwohl es natürlich gerade zur Beurteilung des Vererbungsrisikos an mögliche Nachkommen von großer Wichtigkeit wäre.

4.3.2 Herkunft des Patienten mit kongenitaler Samenleiteraplasie

Um eine gewisse zufriedenstellende Nachweiswahrscheinlichkeit eventuell vorhandener CFTR- Mutationen zu erreichen, sollte in jedem Fall die Herkunft des zu untersuchenden Patienten berücksichtigt werden. Neben der Quantität, der Menge an getesteten CFTR- Mutationen kommt es nämlich auch auf die Qualität an, in dem Sinne als dass bestimmte Mutationen gerade für Patienten einer bestimmten Volkszugehörigkeit besonders von Bedeutung sind. Die folgende Tabelle verdeutlicht, wie unterschiedlich die Verteilung von CFTR- Mutationen in verschiedenen Populationen aussieht.

Tabelle 18: Non- dF508- Mutationen mit einer Frequenz von mehr als 10% im jeweiligen Land.

Population (dF508 in %)	Mutation	Lokalisation	Häufigkeit in %	Referenz
Algerien (34,2)	N1303K	Exon 21	15,8	Lucotte et al., 1994
Estland (35,0)	394delTT	Exon 3	12,0	Teder et al., 1995
Finnland (45,0)	394delTT	Exon 3	30,0	Kerem et al., 1995
Israel (Juden, Ashkenazim) (28,0)	W1282X	Exon 20	47,9	Kerem et al., 1995
Tunesien (30,4)	W1282X	Exon 20	17,4	Kerem et al., 1995
Libanon (36,7)	W1282X	Exon 20	16,7	Desgeorges et al., 1997
Kanada, Hutterer (31,0)	M1101K	Exon 17b	69,0	Zielenski et al., 1993
USA (Pueblo) (0)	R1162X 3848+10kbC>T	Exon 19 Intron 19	68,7 18,8	Mercier et al., 1994
USA (Schwarze) (0)	3120+1G>A	Intron 16	12,2	Mercier et al., 1994
Südafrika (Schwarze) (0)	3120+1G>A	Intron 16	62,5	Carles et al., 1996

Aufgrund geographischer Schwankungen bei der Häufigkeitsverteilung der CFTR-Mutationen ist also die ethnische Herkunft des zu untersuchenden Patienten für das molekulargenetische Diagnostiklabor von großer Bedeutung: nur so kann eine sinnvolle Auswahl der zu testenden Mutationen und eine richtige Einschätzung des

Nachweisniveaus erfolgen. So werden, im Gegensatz zur deutschen Bevölkerung, in der keine der non- dF508- Mutationen eine relative Häufigkeit von mehr als 2,5% erreicht, in verschiedenen Populationen neben der dF508- Mutation durchaus weitere Mutationen mit einer Frequenz von mehr als 10% beobachtet, was in den meisten Fällen auf Gründereffekte zurückzuführen ist. Hierbei wurde im Zuge der Expansion dieser Population eine ansonsten seltene, in einer kleinen Gründerpopulation vorhandene Erbanlage vervielfacht. Besonders beeindruckende Beispiele für Gründereffekte sind die CFTR- Allelverteilungen auf den Färöer- Inseln (dF508, 100%) (Schwartz et al., 1995) und unter den in Nordamerika in isolierten ländlichen Gemeinschaften lebenden Hutteriten (dF508, 35%; M1101K, 65%) (Zielenski et al., 1993), deren Vorfahren aus Österreich stammten. Die Mutation M1101K ist weltweit ansonsten extrem selten, sie wurde bei Untersuchungen von 63 Tiroler CF- Patienten auch nur einmal nachgewiesen (Stuhrmann et al., 1998), was dafür spricht, dass Mutationen nicht dort entstanden sein müssen, wo sie heute besonders häufig sind beziehungsweise dort nicht mehr häufig sein müssen, wo sie einst entstanden sind. In manchen Populationen wie zum Beispiel den Ashkenazi- Juden (Kerem et al., 1995) und den Hutteriten (Zielenski et al., 1993) ermöglicht die hohe Frequenz und die geringe Anzahl der dort auftretenden Mutationen eine nahezu vollständige molekulargenetische Diagnose.

Betrachtet man unsere gewonnenen Ergebnisse hinsichtlich der Herkunft der Patienten mit zwei nachgewiesenen CFTR- Mutationen, so sind 38 unserer CBAVD- Patienten ohne Nierenbeteiligung deutscher Herkunft, die anderen zwölf CBAVD- Patienten ohne Nierenbeteiligung sind englischer, indonesischer, türkischer, afghanischer und italienischer Herkunft. Interessanterweise ließen sich bei achtzehn von 38 CBAVD- Patienten deutscher Herkunft zwei CFTR- Mutationen nachweisen, was einem Anteil von 47,4% entspricht. Von den zwölf CBAVD- Patienten nicht- deutscher Abstammung war lediglich in zwei Fällen der Nachweis einer compound- Heterozygotie für CFTR- Mutationen möglich (16,7%). Sollte eine mangelnde Berücksichtigung der Herkunft unserer CAVD- Patienten mit Ursache für den im Vergleich mit anderen Studien eher niedrigen Anteil an CAVD- Betroffenen mit zwei nachweisbaren Mutationen sein? Festzuhalten gilt jedenfalls, dass hinsichtlich des CFTR- Mutationsspektrums, mit dem die molekulargenetische Routinediagnostik bei CAVD- Patienten durchgeführt wird, sowohl die Anzahl der zu untersuchenden CFTR- Mutationen, als auch eine

populationsspezifische Auswahl der Mutationen von unbedingter Wichtigkeit ist, um eine zufriedenstellende Detektionswahrscheinlichkeit für die Betroffenen zu gewährleisten. Anhaltspunkte dazu kann das Cystic Fibrosis Genetic Analysis Consortium und auch die im Rahmen des BIOMED 1- Programms der Europäischen Gemeinschaft durchgeführte Studie zur Herkunft und Verteilung von CFTR- Mutationen in verschiedenen Regionen Europas (Estivill et al., 1997) geben.

4.3.3 Nachweis von CFTR- Mutationen bei gleichzeitiger Nierenaplasie

Die Suche nach CFTR- Mutationen auf Chromosom 7 bei den acht Patienten, bei denen die kongenitale Samenleiteraplasie mit einer Nierenaplasie einhergeht, verlief in allen Fällen ergebnislos. Dies bekräftigt das Ergebnis bereits vorliegender Studien, die einen Zusammenhang zwischen der angeborenen Samenleiteraplasie und einer Nierenbeteiligung sehen, die allerdings unabhängig von ursächlichen CFTR- Mutationen zu sein scheint (Augarten et al., 1994; Casals et al., 1995; Schlegel et al., 1996). Schlegel et al., untersuchten insgesamt 104 infertile Männer, davon 84 CBAVD und 20 CUAVD- Patienten, wovon 11% beziehungsweise 26% gleichzeitig eine Nierenaplasie aufwiesen und gerade bei diesen Patienten konnten keine CFTR- Mutationen detektiert werden (Schlegel et al., 1996). Mickle et al. veröffentlichten ähnliche Ergebnisse: von 21 Patienten mit CUAVD und kontralateralem undurchgängigen Vas deferens (non- patent- Gruppe) waren vier Patienten (19%) von einer ipsilateralen Nierenaplasie und ein Patient (5%) von einer gleichseitigen Beckennierniere betroffen, insgesamt also 24% mit renalen Anomalien und ohne CFTR- Mutationen (Mickle et al., 1995). Weiske et al. fanden bei 11,8% der CBAVD- und bei 73,7% der CUAVD- Patienten eine einseitige Nierenaplasie, bei 4,1% eine Nierendystopie in Form einer Beckennierniere. Einer der CBAVD- Patienten wies neben der Nierenaplasie noch eine Mutation im CFTR- Gen auf und zwar die Klasse 2- $\Delta F508$ - Mutation, was in diesem Fall allerdings als Zufall interpretiert wurde hinsichtlich der Tatsache, dass diese Mutation eine Heterozygotenfrequenz in der deutschen Bevölkerung von etwa 1:25 aufweist (Weiske et al., 2000). Im Kontrast dazu stehen allerdings die Ergebnisse einer neueren von Casals et al. durchgeführten Untersuchung, in der aufgrund einer extensiven Analyse des gesamten CFTR- Gens von 134 CAVD- Patienten spanischer Herkunft bei etwa einem

Drittel der CAVD- Patienten mit Nierenbeteiligung (5/16) Mutationen im CFTR- Gen nachgewiesen werden konnten (Casals et al., 2000). Bei den entdeckten Mutationen handelte es sich in einem Fall um die dF508- Mutation und in zwei Fällen um die IVS8-5T Variante, also um Mutationen, zu deren Detektion nicht einmal extensive Analysen nötig gewesen wären, sondern die vielmehr in jedem Routineprogramm zur CFTR- Diagnostik miterfasst werden. Jedenfalls handelt es sich bei dieser Veröffentlichung um die erste Untersuchung, in der ein Zusammenhang zwischen CFTR- Mutationen und der angeborenen Samenleiteraplasie mit gleichzeitiger Nierenaplasie festgestellt wurde. Durch diese neuen Erkenntnisse, die eine völlige Unabhängigkeit der Genese der CFTR- bedingten von der mit einer Nierenaplasie einhergehenden CAVD anzweifeln, muss bei CAVD- Patienten mit Kinderwunsch in Zukunft wohl noch gewissenhafter nach möglichen Mutationen im CFTR- Gen gesucht werden, auch wenn der Patient neben der Samenleiteraplasie zusätzlich noch von einer einseitigen Nierenaplasie betroffen ist. Die Aufklärung der Ursachen dieses heterogenen Krankheitsbildes ist wohl immer noch nicht vollständig gelungen, da es sich in unserem Fall um eine retrospektive Studie handelt, die einen Zeitraum von 1994 bis 2003 einschließt, besteht für uns allerdings lediglich die Möglichkeit, gewonnene Ergebnisse zusammenzutragen und diese kritisch zu hinterfragen.

4.3.4 Nachweis von CFTR- Mutationen bei Patienten mit kongenitaler unilateraler Samenleiteraplasie

Bei keinem unserer neun Patienten mit kongenitaler unilateraler Samenleiteraplasie wurde eine Mutation im CFTR- Gen detektiert. Fünf der CUAVD- Patienten weisen gleichzeitig eine ipsilaterale Nierenaplasie auf, was durchaus als Erklärung dienen könnte, warum der Nachweis von CFTR- Mutationen bei diesen fünf Patienten nicht gelingt.

Das Krankheitsbild der kongenitalen unilateralen Samenleiteraplasie an sich widerspricht eigentlich nicht dem gleichzeitigen Vorhandensein von CFTR- Mutationen- in vorangegangenen Untersuchungen wurde das in Abhängigkeit des kontralateralen entweder durchgängigen oder undurchgängigen Samenleiter gesehen. Bei der Gruppe von CUAVD- Patienten mit durchgängigem kontralateralen Samenleiter konnte Mickle

nämlich in keinem Fall CFTR- Mutationen nachweisen, wohl aber bei denen, deren eigentlich angelegter kontralateraler Samenleiter aufgrund nicht- iatrogener Ursache undurchgängig war (Mickle et al., 1995). Die Tatsache, dass bei keinem unserer neun CUAVD- Patienten der Nachweis einer CFTR- Mutation gelang, obwohl in allen Fällen der kontralaterale Samenleiter undurchgängig war, ließ uns die Möglichkeit bedenken, die sekundären kontralateralen Samenleiterverschlüsse vier unserer CUAVD- Patienten (4,7,26,51) seien eventuell iatrogener Ursache und auf die meist im Säuglingsalter durchgeführten chirurgischen Eingriffe in der Leistenregion zurückzuführen, was dann durchaus das Fehlen einer CFTR- Mutation erklären könnte. Casals et al. konnten bei insgesamt 38% ihrer CUAVD- Patienten Mutationen im CFTR- Gen nachweisen, allerdings führten sie extensive Genanalysen mit weitaus umfassenderen Mutationsspektren durch, als es zum jeweiligen Zeitpunkt bei unseren Patienten möglich war. So konnte sie als bisher einzige eine Studie veröffentlichen, in der sie CFTR- Mutationen bei CAVD- Patienten mit Nierenbeteiligung nachweist (Casals et al., 2000). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Heterogenität des Krankheitsbildes der kongenitalen Samenleiteraplasie nicht zu unterschätzen ist, obwohl gerade bei CBAVD Patienten ohne Nierenbeteiligung wohl in erster Linie CFTR- Mutationen dafür verantwortlich zu machen sind. Zur Erforschung näherer Hintergründe zur unilateralen Samenleiteraplasie und den CAVD- Formen mit gleichzeitiger Nierenaplasie wird es wohl noch einiger weiterer Studien bedürfen, wir konnten in unseren Untersuchungen für diese Patienten keinen Zusammenhang mit CFTR- Mutationen erkennen.

In jedem Fall sollte versucht werden- gerade hinsichtlich des heutzutage mittels moderner Refertilisationstechniken zu ermöglichenden Nachwuchses und dem damit verbundenen Vererbungsrisikos- die Diagnostik bei Patienten mit kongenitaler Samenleiteraplasie so weit gehend zu optimieren (genetische Untersuchung) beziehungsweise vorhandenen diagnostische Möglichkeiten auszunutzen (Schweißtest), als dass der Rat suchende Patient optimal aufgeklärt, beraten und behandelt werden kann.

5. Zusammenfassung

Thema meiner Dissertation sind Untersuchungen zur Bedeutung der Mutationen im Cystic- Fibrosis- Transmembrane- Regulator (CFTR)- Gen bei Patienten mit kongenitaler uni- oder bilateralen Samenleiteraplasie unter besonderer Berücksichtigung der Nierenaplasie.

Dabei wird, nach ausführlicher Beschreibung der verschiedenen Klassen von CFTR-Mutationen und möglicher Folgen wie der neben der Samenleiteraplasie ebenfalls durch diese genetischen Veränderungen verursachte Cystische Fibrose, der Zusammenhang zwischen dem Nachweis dieser Mutationen mit verschiedenen Formen der angeborenen Samenleiteraplasie erläutert und nicht zuletzt auch mögliche Gründe für einen, bei einem gewissen Anteil an Patienten fehlenden Mutationsnachweis aufgezeigt.

Von den insgesamt 62 CAVD- Patienten unserer Studie sind 53 von einer beidseitigen, neun Patienten von einer einseitigen Samenleiterfehlanlage betroffen, wobei in diesen Fällen der kontralaterale Samenleiter sekundär obstruiert ist. Drei der CBAVD- Patienten sowie fünf der CUAVD- Patienten liefern gleichzeitig den Befund einer einseitigen Nierenaplasie.

Der Mutationsnachweis im CFTR- Gen gelang bei insgesamt 38 Patienten, davon 20 in homozygotem oder compound- heterozygotem Zustand und 18 in heterozygotem Zustand. Alle Patienten mit nachgewiesener Mutation zählen zur Gruppe der CBAVD- Patienten ohne Nierenbeteiligung. Bei keinem der CUAVD- Patienten wie auch bei keinem der Patienten mit gleichzeitiger Nierenaplasie konnte eine CFTR- Mutation nachgewiesen werden.

Bei den detektierten Mutationen handelt es sich mit Abstand am häufigsten um den dF508-Basenaustausch, danach folgen die R117H- Missense- Mutation und die Spleissvariante IVS8- 5T, häufigster Genotyp unserer Patienten stellt die dF508- Mutation im heterozygoten Zustand oder kombiniert mit der R117H- Mutation dar.

Es verbleiben allerdings 24 Patienten ohne Mutationsnachweis. Dass gerade bei keinem der CUAVD- Patienten sowie keinem der Patienten mit Nierenbeteiligung eine CFTR- Mutation detektiert wurde, erscheint auffällig, gelang doch in vorangehenden Studien

duchaus auch in diesen Kollektiven ein Mutationsnachweis, wenn auch in weitaus geringerem Maße.

Mögliche diskutierte Gründe für eine niedrige Detektionsrate sind in einem zu wenig umfangreichen Spektrum an untersuchten CFTR- Mutationen, vor allem, wenn die genetische Untersuchung bereits vor mehreren Jahren stattgefunden hat, oder einer mangelnden Berücksichtigung der Herkunft des Patienten zu sehen, unterliegt doch die Häufigkeit verschiedener CFTR- Mutationen starker geographischer Schwankungen.

Ausserdem lässt die Heterogenität dieses Krankheitsbildes nicht mit Sicherheit voraussagen, in welchen Fällen überhaupt Mutationen im CFTR- Gen als ursächlich dafür anzusehen sind, zur genaueren Klärung der Ätiologie werden zukünftig wohl weitere, komplexe Untersuchungen notwendig sein.

6. Referenzen

Amelar RD, Hotchkiss RS (1963) Congenital aplasia of the epididymidis and vasa deferentia; effects on semen. *Fertil Steril* 14: 44

Anderson MP, Gregory RJ, Thompson S, Souza DW, Paul S, Mulligan RC, Smith AE, Welsh MJ (1991) Demonstration that CFTR is a chloride channel by alteration of its anion selectivity. *Science* 253: 202-205

Anderson MP, Welsh MJ (1992) Regulation by ATP and ADP of CFTR chloride channels that contain mutant nucleotide-binding domains. *Science* 257: 1701-1704

Anguiano A, Oates RD, Amos JA, Dean M, Gerrard B, Stewart C, Maher TA, White MB, Milunsky A (1992) Congenital bilateral absence of the vas deferens: a primarily genital form of cystic fibrosis. *JAMA* 267: 1794- 1797

Asch RH, Patrizio P, Silber SJ (1992) Ultrastructure of human sperm in men with congenital absence of the vas deferens: clinical implications. *Fertil Steril* 58(1): 190-3

Attardo T, Vicari E, Mollica F, Grazioso C, Burrello N, Garofalo MR, Lizzio MN, Garigali G, Cannizaro M, Ruvolo G, D'Agata R, Calogero AE (2001) Genetic, andrological and clinical characteristics of patients with congenital bilateral absence of the vas deferens. *Int J Androl* 24: 73-79

Augarten A, Yahay Y, Kerem BS, Halle D, Laufer J, Szeinberg A, Dor J, Mashiach S, Gazit E, Madgar I (1994) Congenital bilateral absence of vas deferens in the absence of cystic fibrosis. *Lancet* 344: 1473-1474

Ballabio A, Gibbs RA, Caskey CT (1990) PCR test for cystic fibrosis deletion. *Nature* 343: 220

Bienvenu T, Beldjord C, Adjiman M, Kaplan JC (1993) Male infertility as the only presenting sign of cystic fibrosis when homozygous for the mild mutation R117H. *J Med Genet* 30: 797

Boat T, Welsh M, Beaudet AL (1989) Cystic fibrosis. In: Scriver CL, Beaudet AL, Valle D (Hrsg.) *The Metabolic Basis of Inherited Disease*, 6. Ausgabe, McGraw Hill Verlag, New York, 2649- 2680

Bradbury NA, Jilling T, Berta G, Sorscher EJ, Bridges RJ, Kirk KL (1992) Regulation of plasma membrane recycling by CFTR. *Science* 256: 530- 532

Braun A, Little DP, Köster H (1997) Detecting CFTR- mutations using primer oligo base extension and mass spectrometry. *Clin Chem* 43: 1151- 1158

Bremer S, Hoof T, Wilke M, Busche R, Scholte B, Riordan JR, Maas G, Tümmler B (1992) Quantitative expression patterns of multidrug- resistance P-glyco-protein (MDR1) and differentially spliced cystic fibrosis transmembrane conductance regulator mRNA transcripts in human epithelia. *Eur J Biochem* 206: 137- 149

Carles S, Desgeorges M, Goldman A, Thiar R, Guittard C, Kitazos CA, de Ravel TJL, Westwood ATR, Claustres M, Ramsay M (1996) First report of CFTR mutations in black cystic fibrosis patients of southern African origin. *J Med Genet* 33: 802- 804

Casals T, Bassas L, Ruiz- Romero J, Chillon M, Gimenez J, Ramos MD, Tapia G, Narvaez H, Nunes V, Estivill X (1995) Extensive analysis of 40 patients with congenital absence of the vas deferens : in 50% of cases only one CFTR allele could be detected. *Hum Genet* 95: 205- 211

Casals T, Bassas L, Egozcue S, Ramos MD, Gimenez J, Segura A, Garcia F, Carrera M, Larriba S, Sarquella J, Estivill X (2000) Heterogeneity for mutations in the CFTR gene and clinical correlations in patients with congenital absence of the vas deferens. *Hum Reprod* 15(7): 1476- 1483

Chillon M, Casals T, Gimenez J, Nunes V, Estivill X (1994) Analysis of the CFTR gene in the Spanish population: SSCP screening for 60 known mutations and identification of four new mutations (Q30X, A120T, 1812-1 G>A, 3667del4). *Hum Mutat* 3: 223- 230

Chillon M, Casals T, Mercier B, Bassas L, Lissens W, Silber S, Romey MC, Ruiz- Romero J, Verlingue C, Claustres M, Nunes V, Ferec C, Estivill X (1995) Mutations in the cystic fibrosis gene in patients with congenital absence of the vas deferens. *N Engl J Med* 332: 1475- 1480

Chu CS, Trapnell BC, Murtagh JJ Jr, Moss J, Dalemans W, Jallat S, Mercenier A, Pavirani A, Lecocq JP, Cutting GR, Guggino WB, Crystal RG (1991) Variable detection of exon 9 coding sequences in cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene mRNA transcripts in normal bronchial epithelium. *EMBO J* 10: 1355-1363

Chu CS, Trapnell BC, Curristin S, Cutting GR, Crystal RG (1992) Extensive posttranscriptional deletion of the coding sequences for part of nucleotid- binding fold 1 in respiratory epithelial mRNA transcripts of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene is not associated with the clinical manifestation of cystic fibrosis. *J Clin Invest* 90: 785- 790

Chu CS, Trapnell BC, Curristin S, Cutting GR, Crystal RG (1993) Genetic basis of variable exon 9 skipping in cystic fibrosis transmembrane conductance regulator mRNA. *Nature Genet* 3: 151- 156

Colledge WH, Abella BS, Southern KW, Radcliff R, Jiang C, Cheng SH, MacVinish LJ, Anderson JR, Cuthbert, Evans MJ (1995) Generation and characterisation of a delta F508 cystic fibrosis mouse model. *Nature Genet* 10: 445-452

Cooper DN, Krawczak M (1990) The mutational spectrum of single base-pair substitutions causing human genetic disease : patterns and predictions. *Hum Genet* 85: 55- 74

Costes B, Fanen P, Goossens M, Ghanem N (1993) A rapid, efficient and sensitive assay for simultaneous detection of multiplex cystic fibrosis mutations. *Hum Mutat* 2: 185- 191

Costes B, Girodon E, Ghanem N, Flori E, Jardin A, Soufir JC, Goossens M (1995) Frequent occurrence of the CFTR intron 8 (TG)_n 5T allele in men with congenital bilateral absence of the vas deferens. *Eur J Hum Genet* 3: 285-293

Culard JF, Desgeorges M, Costa P, Laussel M, Ratzakatzara G, Navratil H, Demaille J, Claustres M (1994) Analysis of the whole CFTR coding region and splice junctions in azoospermic men with congenital bilateral aplasia of epididymis or vas deferens. *Hum Genet* 93: 467- 470

Cutting GR, Kasch LM, Rosenstein BJ, Tsui LC, Kazazian HH Jr, Antonarakis SE (1990) Two patients with cystic fibrosis, nonsense mutations in each cystic fibrosis gene, and mild pulmonary disease. *N Engl J Med* 323: 1685-1689

Dean M, White MB, Amos J, Gerrard B, Stewart C, Khaw KT, Leppert M (1990) Multiple mutations in highly conserved residues are found in mildly affected cystic fibrosis patients. *Cell* 61: 863- 870

Dean M, Allikmets R (1995) Evolution of ATP binding cassette transporter genes. *Curr Opin Genet Dev*: 779- 785

Denning CR, Sommers SC, Quigley HJ (1968) Infertility in male patients with cystic fibrosis. *Pediatrics* 41: 7- 17

Desgeorges M, Megarbane A, Guittard C, Carles S, Loiselet J, Demaille J, Claustres M (1997) Cystic fibrosis in Lebanon: distribution of CFTR mutations among Arab communities. *Hum Genet* 100:279- 283

Di Sant'Agnese PA, Darling RC, Perrera GA, Shea E (1953) Abnormal electrolytic composition of sweat in cystic fibrosis of the pancreas. Clinical significance and relationship of the disease. *Pediatrics* 12: 549-563

Di Sant'Agnese PA, Hubbard VS (1984) The gastrointestinal tract. In: Taussig LM (Hrsg): *Cystic fibrosis*. Thieme- Stratton Verlag (New York)

Dorin JR, Dickinson P, Alton EFW, Smith SN, Geddes DM, Stevenson BJ, Kimber WL, Fleming S, Clarke AR, Hooper ML, Anderson L, Beddington RSP, Porteous DJ (1992) Cystic fibrosis in the mouse by targeted insertional mutagenesis. *Nature* 359: 211- 215

Dörk T, Mekus F, Schmidt K, Boßhammer J, Fislage R, Heuer T, Dziadek V, Neumann T, Kälin N, Wulbrand U, Wulf B, Hard H von der, Maas G, Tümmler B (1994) Detection of more than 50 different CFTR mutations in a large group of German cystic fibrosis patients. *Hum Genet* 94: 533- 542

Dörk T, Stuhmann M (1996) *Molekularbiologie der Mukoviszidose*. BIUZ 26: 282-291

Dörk T, Dworniczak B, Aulehla- Scholz C, Wiezorek D, Böhm I, Maverova A, Seydewitz HH, Nieschlag E, Meschede D, Horst J, Prader HJ, Sperling H, Ratjen F, Passarge E, Schmidtke J, Stuhmann M (1997) Distinct spectrum of CFTR gene mutations in congenital absence of the vas deferens. *Hum Genet* 100: 365- 377

Dubin L, Amelar RD (1971) Etiologic factors in 1294 consecutive cases of male infertility. *Fertil Steril* 22: 469- 474

Dumur V, Gervais R, Rigot JM, Lafitte JJ, Mancouvrier S, Biserte J, Mazeman E, Roussel P (1990) Abnormal distribution of CF delta F508 allele in azoospermic men with congenital aplasia of epididymis and vas deferens. *Lancet* 336: 512

Dumur V, Gervais R, Rigot JM, Delomel- Vinner E, Decaestecker B, Lafitte JJ, Roussel P (1996) Congenital bilateral absence of the vas deferens (CBAVD) and cystic fibrosis transmembrane regulator (CFTR). Correlation between genotype and phenotype. *Hum Genet* 97: 7-10

Epstein C (1975) Genetic counseling (statement of the American society of human genetics ad hoc committee on genetic counseling) *Am J Hum Genet* 27: 240- 242

Estivill X, Bancells C, Ramos C and the Biomed CF Mutation Analysis Consortium (1997) Geographic distribution and regional origin of 272 cystic fibrosis mutations in European populations. *Hum Mutat* 10: 135- 154

European Working Group on CF Genetics (1990) Gradient of distribution in Europe of the major CF mutational and of its associated haplotype. *Hum Genet* 85: 436- 445

Frizzell RA (1987) Cystic fibrosis: a disease of ion channels? *Trends Neurosci.* 10: 190- 193

Gervais R, Dumur V, Rigot JM, Lafitte JJ, Roussel P, Claustres M, Demaille J (1993) High frequency of the R117H cystic fibrosis mutation in patients with congenital absence of the vas deferens. *N Engl J Med* 328: 328- 329

Gervais R, Dumur V, Letombe B, Larde A, Rigot JM, Roussel P, Lafitte JJ (1996) Hypofertility with thick cervical mucus : another mild form of cystic fibrosis? *JAMA* 276: 1638

Gibbons MD, Chromie WJ, Duckett JW (1978) Ectopic vas deferens. *J Urol* 120: 597- 604

Gibson LE, Cooke RE (1959) A test for concentration of electrolytes in sweat in cystic fibrosis of the pancreas utilizing pilocarpine by iontophoresis. *Pediatrics* 23: 545

Ginot F (1997) Oligonucleotide micro- assays for identification of unknown mutations: how far from reality? *Hum Mutat* 10: 1- 10

Goldman MJ, Anderson GM, Stolzenberg ED, Kari UP, Zasloff M, Wilson JM (1997) Human β -defensin-1 is a salt- sensitive antibiotic in lung that is inactivated in cystic fibrosis. *Cell* 88: 553- 560

Gottlieb C, Plöen L, Kvist U, Strandvik B (1991) The fertility potential of male cystic fibrosis patients. *Int J Androl* 14: 437- 440

Gregory RJ, Rich DP, Cheng SHH, Souza DW, Paul S, Manavalan P, Anderson MP, Welsh MJ, Smith (1991) Maturation and function of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator variants bearing mutations in putative nucleotide- binding domains 1 and 2. *Mol Cell Biol* 11: 3886- 3893

Gunderson KL, Kopito RR (1995) Conformational states of CFTR associated with channel gating: the role of ATP binding and hydrolysis. *Cell* 82: 231- 239

Hamosh A, Trapnell BC, Zeitlin PL, Montrose- Rafizadeh C, Rosenstein BJ, Crystal RG, Cutting R (1991) Severe deficiency of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator messenger RNA carrying nonsense mutations R553X and W1316X in respiratory epithelial cells of patients with cystic fibrosis. *J Clin Invest* 88: 1880- 1885

Hasegawa H, Skach W, Baker O, Calayag MC, Lingappa V, Verkman AS (1992) A multifunctional aqueous channel formed by CFTR. *Science* 258: 1477- 1479

Heaton ND, Pryor JP (1990) Vasa aplasia and cystic fibrosis . *Br J Urol* 66: 538- 540

Higgins CF (1995) The ABC of channel regulation. *Cell* 82: 693- 696

Highsmith WE Jr., Burch LH, Zhou Z, Olsen JC, Boat TF, Spock A, Gorvoy JT, Quittel L, Friedman KJ, Silverman LM, Boucher RC, Knowles M (1994) A novel mutation in the cystic fibrosis gene in patients with pulmonary disease but normal sweat chloride concentrations. *N Engl J Med* 331: 974- 980

Highsmith WE Jr., Burch LH, Zhou Z, Olsen JC, Strong TV, Smith T, Friedman KJ, Silverman LM, Boucher RC, Collins FS, Knowles M (1997) Identification of a splice site mutation (2789+5G>A) associated with small amounts of normal CFTR mRNA and mild cystic fibrosis. *Hum Mutat* 9: 332- 338

Hiraoka M, Tsukahara H, Ohshima Y, Kasuga K, Ishihara Y, Mayum M (2002) Renal aplasia is the predominant cause of congenital solitary kidneys. *Kidney Int* 61(5): 1840- 1844

Hodson ME (1992) Diabetes mellitus and cystic fibrosis. *Baillière's Clin Endocrin Metab* 6: 797- 805

Hoiby N, Koch C (1990) *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis and its management. *Thorax* 45:881-884

Holsclaw DS, Perlmutter AD, Jockin H, Shwachman H (1971) Genital abnormalities in male patients with cystic fibrosis. *J Urol* 106: 568- 574

Honeyman MS, Silker E (1965) Cystic fibrosis of the pancreas: an estimate of the incidence. *Am J Hum Genet* 17: 461- 465

Hull J, Shackleton S, Harris A (1994) Analysis of mutations and alternative splicing patterns in the CFTR gene using mRNA derived from nasal epithelial cells. *Hum Mol Genet* 3: 1141- 1146

Hundrieser J, Bremer S, Peinemann F, Stuhmann M, Hoffknecht N, Wulf B, Schmidtke J, Reiss J, Maaß G, Tümmler B (1990) Frequency of the delta F508 deletion in the CFTR gene in Turkish cystic fibrosis patients. *Hum Genet* 85: 409- 410

Jarvi K, Zielenski J, Wilschanski M, Durie P, Buckspan M, Tullis E, Markiewicz D, Tsui LC (1995) Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator and obstructive azoospermia. *Lancet* 345: 1578

Kaplan E, Shwachman H, Perlmutter AD, Rule A, Khaw KT, Holsclaw DS (1968) Reproductive failure in males with cystic fibrosis. *N Engl J Med* 279: 65-69

Kartner N, Augustinas G, Jensen TJ, Naismith AL, Riordan JR (1992) Mislocalization of delta F508-CFTR in cystic fibrosis sweat glands. *Nature Genet* 1:321-327

Kartner N, Augustinas G, Kensen TJ, Naismith AL, Riordan JR (1992) Mislocalisation of delta F508-CFTR in cystic fibrosis sweat glands. *Nature Genet* 1: 821- 327

Kerem BS, Rommens JM, Buchanan JA, Markiewicz D, Cox TK, Chakravarti A, Buchwald M, Tsui LC (1989) Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. *Science* 245: 1073- 1080

Kerem E, Corey M, Kerem BS, Rommens J, Markiewicz D, Levison H, Tsui LC, Durie P (1990) The relation between genotype and phenotype in cystic fibrosis- analysis of the most common mutation (delta F508). *N Engl J Med* 323: 1517- 1522

Kerem E, Kalman YM, Yahav Y, Shoshani T, Abeliovich D, Szeinberg A, Rivlin J, Blau H, Tal A, Ben- Tur L, Springer C, Augarten A, Godfrey S, Lerer I, Branski D, Friedman M, Kerem BS (1995). Highly variable incidence of cystic fibrosis and different mutation distribution among different Jewish ethnic groups in Israel. *Hum Genet* 96: 193- 197

Kiesewetter S, Macek M Jr, Davis C, Curristin SM, Chu CS, Graham C, Shrimpton AE, Cashman SM, Tsui LC, Mickle J, Amos J, Highsmith WE, Shuber A, Witt DR, Crystal RG, Cutting GR (1993) A mutation in CFTR produces different phenotypes depending on chromosomal background. *Nature Genet.* 5: 274-278

Knowles M, Gatzky J, Boucher R (1981) Increased bioelectric potential difference across respiratory epithelia in cystic fibrosis. *N Engl J Med* 308: 1489- 1494

Knowles M, Gatzky J, Boucher R (1983) Relative ion permeability of normal and cystic fibrosis nasal epithelium. *J Clin Invest* 71: 1410-1417

Knowlton RG, Cohen- Haguenaer O, Van Cong N, Frezal J, Brown VA, Barker D, Braman JC, Schumm JW, Tsui LC, Buchwald M, Donis- Keller H (1985) A polymorphic DNA marker linked to cystic fibrosis is located on chromosome 7. *Nature* 318: 380- 382

Koch C, Hoiby N (1993) Pathogenesis of cystic fibrosis. *Lancet* 341: 1065- 1069

Kolettis PN, Sandlow JI (2002) Clinical and genetic features of patients with congenital unilateral absence of the vas deferens. *Urol* 60(6): 1073- 1076

Kommission zur Erarbeitung von Richtlinien für die Genetische Beratung des Berufsverbandes Medizinische Genetik e.V. (1994) Information zur genetischen Beratung und Einverständniserklärung. *Med Genet* 6: 305- 306

Kopito LE, Losasky HJ, Shwachman H (1973) Water and electrolytes in cervical mucus from patients with CF. *Fertil Steril* 24: 512- 516

Kugler A, Laccone F, Weidner W, Kallerhoff M (1995) Kongenitale Ductus- deferens- Agenesie und zystische Fibrose. *Urologe A* 348- 350

Kuwayama F, Miyazaki V, Ichikawa I (2002) Embryogenesis of the congenital anomalies of the kidney and the urinary tract. *Nephrol Dial Transplant* 2002; 17 (Suppl. 9) 45- 47

Leung AYH, Wong YPD, Yankaskas JR, Boucher RC (1996) cAMP- but not Ca²⁺- regulated Cl- conductance is lacking in cystic fibrosis mice epididymides and seminal vesicles. *Am J Physiol* 271 (Cell. Physiol. 40): C188- C193

Levine MI, Green RL, Rodnan J (1987) Sweat sodium levels in adults with nasal polyps. *Ann Allergy* 58: 377- 378

Leitlinien zur genetischen Beratung, Berufsverband Medizinische Genetik e.V. (1996). *Med Genet* 8: Heft 3, Sonderbeilage 1-2

Li C, Ramjee Singh M, Reyes E, Jensen T, Chang X, Rommens JM, Bear CE (1993) The cystic fibrosis mutation (delta F508) does not influence the chloride channel activity of CFTR. *Nat Genet* 3: 311- 316

LiPuma JJ, Dasen SE, Nielson DW, Stern BC, Stull TL (1990) Person-to-person transmission of *Pseudomonas cepacia* between patients with cystic fibrosis. *Lancet* 336: 1094- 1096

Lucotte G, Perignon JC, Lenoir G (1994) Transient neonatal hypertrypsinaemia as test for deltaF508 heterozygosity. *Lancet* 337: 988

Lukacs GL, Mohames A, Kartner N, Chang XB, Riordan JR, Grinstein S (1994) Conformational maturation of CFTR but not its mutant Counterpart (delta F508) occurs in the endoplasmic reticulum and requires ATP. *EMBO J* 13: 6076- 6086

Macek M Jr., Vavrova V, Böhm I, Stuhmann M, Reis A, Macek M, Duspivova R, Jelinkova E, Sperling K, Krawczak M, Schmidtke J (1990) Frequency of the delta F508 mutation and flanking marker haplotypes at the cystic fibrosis locus from 167 Czech families. *Hum Genet* 85: 417- 418

Mak V, Zielenski J, Tsui L-C, Durie P, Zini A, Martin S, Longley TB, Jarvi KA (1999) Proportion of cystic fibrosis gene mutations not detected by routine testing in men with obstructive azoospermia. *JAMA* 281 (23): 2217- 2224

Mercier B, Ragueneas O, Estivill X, Morral N, Kaplan GC, McClure M, Grebe TA, Kessler D, Pignatti PF, Marigo C, Bombieri C, Audrezet MP, Verlingue C, Ferec C (1994) Complete detection of mutations in cystic fibrosis patients of Native American origin. *Hum Genet* 94: 629- 632

Mercier B, Verlingue C, Lissens W, Silber SJ, Novelli G, Bonduelle M, Audrezet MP, Ferec C (1995) Is congenital bilateral absence of the vas deferens a primary form of cystic fibrosis? Analyses of the CFTR gene in 67 patients. *Am J Hum Genet* 56: 272-277

Meschede D, Dworniczak B, Behre HM, Kliesch S, Claustres M, Nieschlag E, Horst J (1997) CFTR gene mutations in men with bilateral ejaculatory- duct obstruction and anomalies of the seminal vesicles. *Am J Hum Genet* 61: 1200- 1202

Mickle J, Milunsky A, Amos JA, Oates RD (1995) Congenital unilateral absence of the vas deferens: a heterogeneous disorder with two distinct subpopulations based upon aetiology and mutational status of the cystic fibrosis gene. *Hum Reprod* 10: 1728- 1735

Miller SA, Dykes DD, Polesky HF (1988) A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* 16: 1215

Miller C (1993) Sickly channels in mild disease. *Nature* 362: 106

Morral N, Nunes V, Casals T, Cobos N, Asensio O, Dapena J, Estivill X (1993) Uniparental inheritance of microsatellite alleles of the cystic fibrosis gene (CFTR): Identification of a 50 kilobase deletion. *Hum Mol Genet* 2: 677- 681

Morral N, Bertranpetit J, Estivill X, Nunes V, Casals T, Gimenez J, Reis A, Varon- Mateeva R, Macek M Jr, Kalaydjieva L, Angelicheva D, Dancheva R, Romeo G, Russo MP, Garneone S, Restagno G, Ferrari M, Magnani C, Claustres M, Desgeorges M, Schwartz M, Schwarz M, Dallapiccola B, Novelli G, Ferec C, de Arce M, Nemeti M, Kere J, Anvret M, Dahl N, Kadasi L (1994) The origin of the major cystic fibrosis mutation (delta F508) in European populations. *Nature Genet* 7: 169- 175

Myers RH, Lumelsky N, Lerman LS, Maniatis T (1995) Detection of single base substitutions in total genomic DNA. *Nature* 313: 495- 497

Narren AP, Nelson DJ, Xie W, Jovov B, Pevsner J, Bennett MK, Benos DJ, Quick MW, Kirk KL (1997) Regulation of CFTR chloride channels by syntaxin and Munc 18 isoforms. *Nature* 390: 302- 305

Nelson RE (1950) Congenital absence of the vas deferens: a review of the literature and report of three cases. *J Urol* 63: 176- 182

Nygren K, Andersen A (2001) Assisted reproductive technology in Europe, 1997: Results generated from European registers by ESHRE. *Hum Reprod* 16: 384- 391

Nygren KG, Nyboe Andersen A (2002) Assisted reproductive technology in Europe, 1999. Results generated from European registers by ESHRE. *Hum Reprod* 17 (12): 3260

Oates RD, Amos JA (1994) The genetic basis of congenital bilateral absence of the vas deferens and cystic fibrosis. *J Androl* 15: 1- 8

Oppenheimer EH, Case AL, Esterly JR, Rothberg RM (1970) Cervical mucus in cystic fibrosis: a possible cause of infertility. *Am J Obstet Gynec* 108: 673- 674

Orita M, Iwahana K, Kanazawa H, Hayashi K, Sekiya T (1989) Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single- strand conformation polymorphisms. *P Natl Acad Sci* 86: 2766- 2770

Osborne L, Santis G, Schwarz M, Klinger K, Dörk T, McIntosh I, Schwartz M, Nunes V, Macek M Jr, Reiss J, Highsmith WE Jr, McMahon R, Novelli G, Malik N, Bürger J, Anvred M, Wallace A, Williams C, Mathew C, Rozen R, Graham G, Gasparini P, Bal J, Cassiman JJ, Balassopoulou A, Davidow L, Rasbrand S,

Kalaydjieva L, Kerem BS, Richards S, Simon- Bouy B, Super M, Wulcola B, Stuhmann M, Beards F, Hill AJM, Pignatti PF, Cuppens H, Angelicheva D, Tümmler B, Brock DJH, Casals T, Macek M, Schmidke J, Magee AC, Bonizzato A, DeBoeck C, Kuffardijeva A, Hodson M, Knight RA (1992) Incidence and expression of the N1303K mutation of the cystic fibrosis (CFTR) gene. *Hum Genet* 89: 653- 658

Patrizio P, Asch RH, Handelin B, Silber SJ (1993) Aetiology of congenital absence of the vas deferens: genetic study of three generations. *Hum Reprod* 8: 215- 220

Pier GB, Grout M, Zaldi TS, Olsen JC, Johnson LG, Yankaskas JR, Goldberg JB (1996) Role of mutant CFTR in hypersusceptibility of cystic fibrosis patients to lung infections. *Science* 271: 63- 67

Pier GB, Grout M, Zaldi TS (1997) Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is an epithelial cell receptor for clearance of *Pseudomonas aeruginosa* from the lung. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 12088-12093

Quinton PM (1983) Chloride impermeability in cystic fibrosis. *Nature* 301: 421- 422

Reis A, Bremer S, Schlösser M, Dück M, Böhm I, Hundrieser J, Macek M Jr, Stuhmann M, Wagner M, Posselt HG, Wahn U, Reiss J, Trefz FK, Tümmler B, Krawczak M, Schmidtke J (1990) Distribution patterns of the delta F508 mutation in the CFTR gene on CF linked marker haplotypes in the German population. *Hum Genet* 85: 421- 422

Rickers A, Rininsland F, Osborne L, Reiss J (1994) Skipping of multiple CFTR exons is not a result of single exon omissions. *Hum Genet* 94: 311- 313

Rigot JM, Lafitte JJ, Dumur V, Gervais R, Manouvrier S, Biserte J, Mazeman E (1991) Cystic fibrosis and congenital absence of the vas deferens. *N Engl J Med* 325: 64- 65

Riordan JR, Rommens JM, Kerem BS, Alon N, Rozmahel R, Grzelczak Z, Zielenski J, Lok S, Plavsic N, Chou JL, Drumm ML, Iannuzzi MC, Collins FS, Tsui LC (1989) Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science* 245: 1066- 1073

Riordan JR (1993) The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Annu Rev Physiol* 55: 609-630

Rommens JM, Iannuzzi MC, Kerem BS, Drumm ML, Melmer G, Dean M, Rozmahel R, Cole JL, Kennedy D, Hidaka N, Zsiga M, Buchwald M, Riordan JR, Tsui LC, Collins FS (1989) Identification of the cystic fibrosis gene : chromosome walking and jumping. *Science* 245 : 1059- 1065

Rommens JM, Kerem BS, Greer W, Chang P, Tsui LC, Ray P (1990) Rapid non- radioactive detection of the major cystic fibrosis mutation. *Am J Hum Genet* 46: 395- 396

Rubin SO (1975) Congenital absence of the vas deferens. *Scand J Urol Nephrol* 9: 94- 99

Salzbrunn A, Benson DM, Holstein AF, Schulz W (1996) A new concept for the extraction of testicular spermatozoa as a tool for assisted fertilization. *Hum Reprod* 11: 11752- 11755

Schellen TMCM, van Stratten A (1980) Autosomal recessive hereditary congenital aplasia of the vasa deferentia in four siblings. *Fertil Steril* 35: 401- 404

Schlegel PN, Shin D, Goldstein M (1996) Urogenital abnormalities in men with congenital absence of the vas deferens. *J Urol* 155: 1644- 1648

Schwartz M, Johansen HK, Koch C, Brandt NJ (1990) Frequency of the deltaF508 mutation on cystic fibrosis chromosomes in Denmark. *Hum Genet* 85: 427- 428

Schwartz M, Sorensen N, Brandt NJ, Hogdal E, Holm T (1995) High incidence of cystic fibrosis on the Faroe islands: a molecular and genealogical study. *Hum Genet* 95: 703- 706

Schwarzer JU, Fiedler K, von Hertwig I, Krüsmann G, Würfel W, Schleyer M, Mühlen B, Pickl U, Löchner-Ernst D (2003) Sperm retrieval procedures and intracytoplasmic spermatozoa injection with epididymal and testicular sperms. *Urol Int* 70:119-123

Schwiebert EM, Egan ME, Hwang TH, Fulmer SB, Allen SS, Cutting GR, Guggino WB (1995) CFTR regulates outwardly rectifying chloride channels through an autocrine mechanism involving ATP. *Cell* 81: 1063- 1073

Scully RE, Goldabini JJ, McNeely BV (1977) Case reports of the Massachusetts General Hospital (CPCs). *N Engl J Med* 296: 1519- 1526

Sheppard DN, Rich DP, Ostedgaard LS, Gregory RJ, Smith AE, Welsh MJ (1993) Mutations in CFTR associated with mild- disease form Cl⁻ channels with altered pore properties. *Nature* 362: 160- 164

Silber SJ, Nagy ZP, Liu J, Godoy H, Devroey P, van Steirteghem AC (1994) Conventional in- vitro fertilization versus intracytoplasmic sperm injection for patients requiring microsurgical sperm aspiration. *Hum Reprod* 9: 1705- 1709

Silber SJ, Devroey P, Tournaye H, van Steirteghem AC (1995) Fertilization capacity of epididymal and testicular sperm using intracytoplasmic sperm injection (ICSI). *Reprod Fertil Dev* 1995; 7(2): 281- 291, discussion 292- 3

Silber SJ, van Steirteghem AC, Liu J, Nagy Z, Tournaye H, Devroey P (1995) High fertilization and pregnancy rate after intracytoplasmic sperm injection with spermatozoa obtained from testicle biopsy. *Hum Reprod* 10(1): 148- 152

Silber SJ, Nagy Z, Liu J, Tournaye H, Lissens W, Ferec C, Liebaers I, Devroey P, van Steirteghem AC (1995) The use of epididymal and testicular spermatozoa for intracytoplasmic sperm injection: the genetic implications for male infertility. *Hum Reprod* 10(8): 2031- 2043

Silber SJ (1998) Intracytoplasmic sperm injection today: A personal review. *Hum Reprod* 13 (suppl. 1): 208- 218

Smith JJ, Travis SM, Greenberg EP, Welsh MJ (1996) Cystic fibrosis airway epithelial fail to kill bacteria because of abnormal airway surface fluid. *Cell* 85: 229- 236

Strachnan T, Read AP (Hrsg.), *Molekulare Humangenetik*, Seiten 286- 291, Spektrum Lehrbuch Verlag Heidelberg, Berlin, Oxford, 1996, 2.Edition

Stern RC, Boat TF, Doershuk CF (1982) Obstructive azoospermia as a diagnostic criterion for the cystic fibrosis syndrome. *Lancet* I: 1401- 1404

Strong TV, Wilkinson DJ, Mansoura MK, Devor DC, Henze K, Yang Y (1993) Expression of an abundant alternatively spliced form of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene is not associated with a c-AMP- activated chloride conductance. *Hum Mol Gen* 2, 225- 230

Stuhrmann M, Dörk T, Krawczak M, Dück M, Banholzer U, Domagk J, Hoffknecht N, Posselt HG, Reis A, Schlösser M, Trefz FK, Wagner M, Wahn U, Wulf B, Schmidke J, Reiss J, Tümmler B (1991) Genotype phenotype correlations in cystic fibrosis patients. In: Tsui LC, Romeo G, Greger R, Gorini S (Hrsg.), *The*

identification of the CF (cystic fibrosis) gene: recent progress and new research strategies. Seiten 97-101, Plenum Press Verlag New York, 1991

Stuhrmann M (Hrsg.) Untersuchungen zur molekularen Ursache der Mukoviszidose- Das Spektrum der Mutationen im CFTR- Gen und deren Auswirkungen auf Phänotyp, Therapie, Diagnostik und genetische Beratung der Mukoviszidose. Habilitationsschrift für das Fach Humangenetik, Medizinische Hochschule Hannover, 1998

Stutts MJ, Canessa CM, Olsen JC, Hamrick M, Cohn JA, Rossier BC, Boucher RC (1995) CFTR as a cAMP- dependent regulator of sodium channels. *Science* 269: 847- 850

Taille A, Rigot JM, Mahe P (1998) Correlation between genito- urinary anomalies, semen analysis and CFTR genotype in patients with congenital bilateral absence of the vas deferens. *Br J Urol* 81, 614- 619

Teder M, Klaassen T, Lind J, Metspalu A (1995) Detection of CFTR Mutations in Estonia. *Med Genet* 7: H172

The Cystic Fibrosis Genetic Analysis Consortium (1990) Worldwide survey of the delta F508 mutation: Report of the Cystic Fibrosis Genetic Analysis Consortium. *Am J Hum Genet* 47: 354- 359

The Cystic Fibrosis Genetic Analysis Consortium (1994) Population variations of common cystic fibrosis mutations. *Hum Mutat* 4: 167- 177

The Cystic Fibrosis Genotype- Phenotype Consortium (1993) Correlation between genotype and phenotype in patients with cystic fibrosis. *N Engl J Med* 329: 1308- 1303

Thomas PJ, Qu BH, Pedersen PL (1995) Defective protein folding as a basis of human disease. *Trends. Biochem Sci* 20: 456- 459

Treize AEO, Linder CC, Grieger D, Thompson EW, Meunier H, Griswold MD, Buchwald M (1993) CFTR expression is regulated during both the cycle of the seminiferous epithelium and the estrous cycle of rodents. *Nature Genet* 3: 157- 164

Tsui LC, Buchwald M, Barker D, Braman JC, Knowlton R, Schumm JW, Eiberg H, Mohr J, Kennedy D, Plavsic N, Zsiga M, Markiewicz D, Acots G, Brown V, Helms C, Gravius T, Parker C, Rediker K, Donis-Keller H (1985) Cystic fibrosis locus defined by a genetically linked polymorphic DNA marker. *Science* 230: 1054- 1057

Tsui LC (1991) Probing the basic fibrosis. *Curr Opin Genet Develop* 1: 4- 9

Van der Ven K, Messer L, van der Veen H, Jeyendran RS, Ober C (1996) Cystic fibrosis mutation screening in healthy men with reduced sperm quality. *Hum Reprod* 11: 513- 517

Van der Ven K, Peschka B, Montag M, Lange R, Schwanitz G, van der Ven HH (1998) Increased frequency of congenital chromosome aberrations in female partners of couples undergoing intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 13(1): 48

Van Steirteghem AC, Nagy Z, Joris H, Lui J, Staessen C, Smits J, Wisanto A, Devroey P (1993) High fertilization and implantation rates after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 8: 1061- 1066

Van Steirteghem AC (2001) Twenty years of in vitro fertilization: realization and questions for the future. *Verh K Acad Geneesk Belg* 63(3): 193- 240

Van Steirteghem AC, Devroey P, Libaers I (2002) Intracytoplasmic sperm injection. *Mol Cell Endocrinol* 186(2): 199- 203

- Van Steirteghem AC, Bonduelle M, Devroey P, Liebaers I (2002) Follow-up of children born after ICSI. *Hum Reprod* 8(2): 111- 116
- Vernaev V, Tournaye H, Osmanagaoglu K, Verheyen G, van Steirteghem A, Devroey P (2003) Intracytoplasmic sperm injection with testicular spermatozoa is less successful in men with nonobstructive azoospermia than in men with obstructive azoospermia. *Fertil Steril* 79 (3): 529- 533
- Vidaud M, Fanen P, Martin J, Ghanem N, Nicholas S, Goossens M (1990) Three mutations in the CFTR gene in French cystic fibrosis patients: identification by denaturing gradient gel electrophoresis. *Hum Genet* 85: 446- 449
- Vohra S, Morgentaler A (1997) Congenital anomalies of the vas deferens, epididymis and seminal vesicles. *Urology* 49: 313- 321
- Wainwright BJ, Scamler PJ, Schmidke J, Watson EA, Law HY, Farrall M, Cooke HJ, Eiberg H, Williamson R (1985) Localization of cystic fibrosis locus to human chromosome 7cen- q22. *Nature* 318: 384- 385
- Wang Z, Milunsky J, Yamin M, Maher T, Oates R, Milunsky A (2002) Analysis by mass spectrometry of 100 cystic fibrosis gene mutations in 92 patients with congenital bilateral absence of the vas deferens. *Hum Reprod* 17(8): 2066- 2072
- Ward CL, Kopito RR (1994) Intracellular turnover of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. Inefficient processing and rapid degradation of wild-type and mutant proteins. *J Biol Chem* 269: 25710- 25718
- Weiske W-H, Sälzler N, Schroeder- Printzen I, Weidner W (2000) Clinical findings in congenital absence of the vasa deferentia. *Androl* 32: 13- 18
- Welsh MJ, Smith AE (1993) Molecular mechanisms of CFTR chloride channel dysfunction in cystic fibrosis. *Cell* 73: 1251- 1254
- Welsh MJ (1994) The path of discovery in understanding the biology of cystic fibrosis and approaches to therapy. *Am J Gastroenterol* 89: S97- S105
- Welsh MJ, Tsui LC, Boat TF, Beaudet AL (1995) Cystic fibrosis. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly W und Valle D (Hrsg.): *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. 7. Auflage, 3799- 3876, McGraw Hill Inc. Verlag, New York
- White R, Woodward S, Leppert M, O'Connell P, Hoff M, Herbst J, Lalouel JM, Dean M, Vande Woude G (1985) A closely linked genetic marker for cystic fibrosis. *Nature* 318: 382- 384
- Widdicombe JH, Welsh MJ, Finkbeiner WE (1985) Cystic fibrosis decreases the apical membrane chloride permeability of monolayers cultured from cells of tracheal epithelium. *P Natl Acad Sci* 82: 6167- 6171
- Will K, Stuhmann M, Dean M, Schmidtke J (1993) Alternative splicing in the first nucleotide binding fold of CFTR. *Hum Mol Genet* 2: 231- 235
- Will K, Dörk T, Stuhmann M, von der Hardt H, Ellemunter H, Tümmler B, Schmidtke J (1995) Transcript analysis of CFTR nonsense mutations in lymphocytes and nasal epithelial cells from cystic fibrosis patients. *Hum Mutat* 5: 210- 220

Williams C, Mayall ES, Williamson R, Hirsh A, Cookson H (1993) A report on CF carrier frequency among men with infertility owing to congenital absence of the vas deferens. *J Med Genet* 30: 973- 974

Wüffel W, Krüsmann G, Fiedler K, von Hertwig I, Schleyer M, Böhm I, Ovens- Raeder A, Wiedemann U, Waldenmaier C, Schwarzer U (1998) Intrazytoplasmatische Injektion (ICSI) von kryokonservierten testikulären Spermatozoen (Kryo- TESE): Eine retrospektive Analyse der ersten 250 Behandlungszyklen. *Zentralbl Gynakol* 120: 386- 390

Wilschanski M, Corey M, Durie P, Tullis E, Bain J, Asch M, Ginzburg B, Jarvi K, Buckspan M, Hartwick M (1996) Diversity of reproductive tract abnormalities in men with cystic fibrosis. *JAMA* 276: 607- 608

Xia Y, Haws CM, Wine JJ (1997) Disruption of monolayer integrity enables activation of a cystic fibrosis "bypass" channel in human airway epithelia. *Nature Med* 3: 802- 805

Young D (1949) Bilateral aplasia of the vas deferens. *Br J Surg* 36 : 417

Zeitlin PL, Crawford I, Lu L, Woel S, Cohen ME, Donowitz M, Montrose MH, Hamosh A, Cutting GR, Gruenert D, Haganir R, Maloney P, Guggino WB (1992) CFTR protein expression in primary and cultured epithelia. *Proc Nat Acad Sci* 89: 344- 347

Zielenski J, Rozmahel R, Bozon D, Kerem BS, Grzelczak Z , Riordan JR, Rommens JM, Tsui LC (1991) Genomic DNA sequence of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene. *Genomics* 10: 214- 228

Zielenski J, Fujiwara TM, Markiewicz D, Paradis AJ, Anacleto AJ (1993) Identification of the M1101K mutation in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene and complete detection of cystic fibrosis mutations in the Hutterite population. *Am J Hum Genet* 52: 609- 615

Zielenski J, Tsui LC (1995) Cystic fibrosis : Genotypic and phenotypic variations. *Annu Rev Genet* 29: 777- 807

Zielenski J, Patrizio P, Corey M, Handelin B, Markiewitz D, Asch R, Tsui LC (1995) CFTR gene variant for patient with congenital absence of the vas deferens. *Am J Hum Genet* 57: 958- 960

Zumbé J, Beintker M, Denil J, Fornara P, Miersch W-D, Schroeder- Printzen I, Schwarzer U, Sperling H, Weiske WH (1996) *Androl* 28 (Supp. 1): 89- 92

Anhang: Patientenübersicht, geordnet nach Aufnahme datum (1994- 2002)

Patient	Alter (Jahre)	Genotyp	Diagnose	Herkunft
1	31	(+/-) dF508 (+/-) IVS8- 5T	CBAVD	D
2	37	(-/-)	CBAVD	D
3	32	(+/-) dF508 (+/-) IVS8- 5T	CBAVD	D
4	36	(-/-)	CUAVD rechts	D
5	38	(+/-) dF508 (+/-) L1388Q	CBAVD	D
6	34	(+/-) dF508	CBAVD	D
7	34	(-/-) schriftlicher Befund fehlt	CUAVD rechts Nierenaplasie rechts	D
8	35	(+/-) G551D	CBAVD	D
9	35	(-/-)	CUAVD links Nierenaplasie links	D
10	28	(-/-)	CBAVD	D

11	34	(+/-) dF508 (+/-) R117H	CBAVD	D
12 (t)	29	(+/+) dF508 (+/+) 3272-26A>G	CF, CBAVD	D
13	41	(+/-) dF508 (+/-) R117H	CBAVD	D
14	31	(+/+) dF508	CF CBAVD	D
15	32	(+/-) dF508	CBAVD	D
16	34	(+/+) dF508 (+/+) 3272- 26A>G	CF, CBAVD	D
17	31	(+/-) dF508	CBAVD	D
18	34	(+/-) F508 (+/-) R117H	CBAVD	GB
19	32	(-/-)	CBAVD	D
20	29	(+/-) dF508 (+/-) R117H	CBAVD	D
21	35	(+/-) dF508	CBAVD	A
22	40	(+/-) dF508	CBAVD	D
23	30	(-/-)	CBAVD Nierenaplasie links	D
24	36	(+/-) dF508	CBAVD	D
25	39	(-/-)	CBAVD	D

26	35	(-/-)	CUAVD rechts Nierenaplasie rechts Beckenniere links	D
27	32	(+/-) dF508 (+/-) IVS8- 5T	CBAVD	D
28	36	(+/-) dF508 (+/-) R117H	CBAVD	D
29	33	(-/-)	CBAVD	Indonesien
30	29	(+/-) dF508	CBAVD	D
31	45	(+/-) dF508 (+/-) R117H	CBAVD	D
32	25	(+/-) dF508	CBAVD	D
33	34	(+/-) dF508	CBAVD	D
34	31	(-/-)	CBAVD	D
35	35	(-/-)	CUAVD links Nierenaplasie links	Italien
36	33	(-/-)	CBAVD	Italien
37	29	(-/-)	CUAVD links	D
38	26	(+/-) dF508	CBAVD	D
39	37	(+/-) dF508 (+/-) IVS8- 5T	CBAVD	D

40	32	(+/-) R117H	CBAVD	Türkei
41	30	(-/-)	CUAVD	D
42	31	(+/-) dF508	CF, CBAVD	D
43	38	(+/-) IVS8- 5T	CBAVD	Türkei
44	25	(-/-)	CBAVD	Türkei
45	35	(+/-) dF508 (+/-) IVS8- 5T	CBAVD	D
46	39	(-/-)	CBAVD	D
47	30	(+/-) IVS8- 5T	CBAVD	Türkei
48	32	(-/-)	CBAVD Nierenaplasie rechts	D
49	30	(-/-)	CUAVD links	D
50	40	(+/-) R117H	CBAVD	Afghanistan
51	32	(-/-) schriftlicher Befund fehlt	CUAVD links Nierenaplasie links	GB
52	29	(+/-) dF508 (+/-) IVS8- 5T	CBAVD	Italien
53	39	(+/-) dF508 (+/-) R117H	CBAVD	D
54	33	(+/-) IVS8- 5T	CBAVD	Italien
55	41	(-/-)	CBAVD	Italien

			Nierenaplasie rechts Beckenniere links	
56	30	(+/-) R117H	CBAVD	D
57	29	(-/-)	CBAVD	D
58	30	(+/-) dF508 (+/-) R117H	CBAVD	D
59	31	(+/-) IVS8- 5T	CBAVD	D
60	35	(-/-)	CBAVD	D
61	32	(+/-) W1282X	CBAVD	D
62	33	(-/-)	CBAVD	D

Danksagung

Herrn Univ. Prof. Dr. med. Rudolf Hartung, Direktor der Urologischen Klinik der Technischen Universität München, danke ich für die Unterstützung und Möglichkeit zur Promotion an seinem Lehrstuhl.

Herrn Univ. Prof. Dr. med. Wolfgang Engel, Direktor des Instituts für Humangenetik der Universität Göttingen, danke ich für die stets hilfreiche Unterstützung.

Besonders danken möchte ich Herrn Prof. Dr. med. J. Ullrich Schwarzer, Praxis und Abteilung für Urologie am Klinikum Freising, für die individuelle Unterstützung und Betreuung von den ersten Entwürfen an bis hin zur Fertigstellung dieser Arbeit.