

# Genetische Defekte bei primärer ziliärer Dyskinesie

**Die primäre ziliäre Dyskinesie („primary ciliary dyskinesia“, PCD) ist eine seltene hereditäre Erkrankung mit einer Häufigkeit von etwa 1:20.000. Es handelt sich um eine genetisch und klinisch heterogene Krankheit. Mehrere Gendefekte konnten bereits charakterisiert werden [1]. Es ist anzunehmen, dass eine Vielzahl weiterer Defekte in naher Zukunft identifiziert wird.**

Die verminderte mukoziliäre Reinigung der Atemwege wird durch eine angeborene Dysfunktion der Atemwegszilien (Flimmerhärchen) verursacht und bedingt chronische Infektionen der Atemwege. Neben Mittelohrentzündungen und Affektionen der Nasennebenhöhlen kommt es aufgrund chronischer entzündlicher Prozesse häufig zur Entwicklung von irreversiblen Bronchiektasen.

Der Erkrankungsphänotyp kann stark variieren. Einige Patienten zeigen eine eher milde Ausprägung, andere entwickeln ein chronisches Lungenversagen im mittleren Erwachsenenalter und bedürfen einer Lungentransplantation.

Die Diagnose der PCD basiert auf dem Vorliegen zweier Kriterien:

1. rezidivierende Infektionen der Atemwege mit oder ohne Situs inversus,
2. Nachweis von immotilen/dysmotilen Zilien oder Spermien mittels Direktmikroskopie oder alternativ Nachweis typischer ultrastruktureller Defekte mittels Elektronenmikroskopie [2, 3].

Eine Reihe unterschiedlicher Störungen wie z. B. Herzfehler, Hydrozephalus inter-

nus, Retinitis pigmentosa, zystische Nierenerkrankungen oder Schwerhörigkeit können assoziiert auftreten und komplizieren das Krankheitsbild, wodurch die Diagnose häufig verspätet gestellt wird [1].

In dieser Übersichtsarbeit sollen die Pathophysiologie und Genetik des PCD-Erkrankungskomplexes vorgestellt werden.

## Phänotyp der Zilienfunktionsstörungen

Eine Reihe verschiedener Zelltypen in verschiedenen Geweben oder Organen besitzt Zilien (■ Abb. 1). Dysfunktionen dieser Organellen können beim PCD-Patienten neben den Atemwegsinfektionen zu weiteren assoziierten Symptomen führen und tragen zur klinischen Heterogenität des PCD-Komplexes bei.

## Zufällige Anordnung der Links-rechts-Körperasymmetrie (Situs inversus)

Die Hälfte der PCD-Betroffenen zeigt das Bild eines Situs inversus (spiegelbildliche Vertauschung der Links-rechts-Körperasymmetrie). Dies ist dadurch erklärbar, dass während der frühen embryonalen Entwicklung Zilien im Bereich des Knotens (nodale Zilien) maßgeblich für die Determinierung der Links-rechts-Körperasymmetrie verantwortlich sind. Die Zellen des embryonalen Knotens tragen jeweils eine Monozilie [4], welche permanent im Uhrzeigersinn rotiert. Die dadurch erzeugte Strömung („nodal flow“) der umgebenden Flüssigkeit führt wahrscheinlich zur Aktivierung sensorischer Zilien [1]. In der Folge kommt es zur asym-

metrischen Genexpression von Transkriptionsfaktoren wie „nodal“ und „lefty“.

Wahrscheinlich unterbleibt bei PCD-Patienten die Ausbildung des „nodal flow“, da die nodalen Zilien vermutlich immotil sind. Dadurch entsteht eine zufällige Anordnung der Links-rechts-Körperasymmetrie.

Deshalb erscheint, aus stochastischen Gründen, bei der Hälfte der PCD-Patienten ein Situs inversus. Die Assoziation desselben mit PCD wird auch als Kartagener-Syndrom bezeichnet.

## Infertilität

Männliche PCD-Betroffene sind häufig infertil. Ursächlich sind dysmotile oder unbewegliche Spermenschwänze. Dies lässt sich durch die identische axonemale Struktur von Spermenschwänzen und Zilien erklären. Einige weibliche PCD-Patienten zeigen, vermutlich aufgrund einer gestörten ziliären Transportfunktion der Eileiter, eine reduzierte Fertilität. Aufgrund des gleichen Defekts ist möglicherweise die Rate der Tubargraviditäten erhöht.

## Hydrozephalus internus

Seltener liegen bei PCD-Patienten assoziierte Erkrankungsmanifestationen wie ein Hydrozephalus internus vor. Ependymzellen kleiden die inneren Hirnwasserräume aus und tragen motile Zilien. Deren Rolle war lange unklar. Der Nachweis der obligatorischen Hydrozephalusentwicklung in der *Mdnah5*<sup>-/-</sup>-Maus, einem Knockout-Tiermodell für PCD, wies auf eine Funktion derselben bei der Aufrechterhaltung des Liquortransports hin [5].

Die exakte ultrastrukturelle und funktionelle Analyse muriner Ependymzellen ergab, dass der gerichtete Schlag der Ependymzilien einen Liquorfluss innerhalb des Aquaeductus cerebri („ependymal flow“) erzeugt, der während der Hirnentwicklung für die Durchgängigkeit des Aquaeductus cerebri, der den III. mit dem IV. Hirnventrikel verbindet, essenziell ist.

*Mdnah5*<sup>-/-</sup>-Mäuse entwickeln infolge des Aquäduktverschlusses einen triventrikulären Hydrocephalus internus. Epidemiologische Untersuchungen zeigten, dass die Rate von angeborenen Aquäduktverschlüssen (Aquäduktstenosen) mit begleitendem Hydrocephalus internus bei PCD-Patienten erhöht ist. Dies belegt, dass der pathophysiologische Mechanismus der Hydrozephalusentstehung in der *Mdnah5*<sup>-/-</sup>-Maus auch beim Menschen eine Rolle spielt [6].

### Sonstige Erkrankungen

Eine Reihe anderer Erkrankungen wird ebenfalls durch Zilienfunktionsstörungen verursacht [1]. Bei zystischen Nierenerkrankungen konnten Ziliendefekte sensorischer renaler tubulärer Zellen nachgewiesen werden [7, 8]. Selten weisen PCD-Patienten zystische Nierenerkrankungen (z. B. Nephronophthise) auf. Dysfunktionen der „connecting cilia“, welche das äußere mit dem inneren Segment des Photorezeptors verbindet, können Retinitis pigmentosa verursachen. Andere assoziierte Störungen umfassen z. B. angeborene Herzfehler, Innenohrschwerhörigkeit und biliäre Leberfibrosen.

### Zilienfunktion

#### Anatomie der motilen Zilien

Ein Querschnitt durch eine Atemwegsziele zeigt die typische Anatomie des so genannten Axonems (■ Abb. 2). Das Axonem der respiratorischen Zilien besteht aus 9 peripheren Mikrotubuluspaaren (A- und B-Tubulus), die um 2 zentral gelegene Einzelröhren angeordnet sind (9+2-Struktur). In einigen Fällen, wie bei der beweglichen nodalen Monozilie, fehlen die zentralen Mikrotubuli (9+0-Struktur). An den peripheren A-Tubuli sind die radial ausge-

richteten Speichen sowie die inneren und äußeren Dyneinarme verankert [9].

Die axonemalen Dyneine sind die biologischen Motoren, welche die Bewegung der Zilien vermitteln, wobei die schweren Dyneinketten die Schlüsselfunktion bei der Bewegungsentstehung innehaben.

Ihre Basis ist permanent mit einem A-Tubulus verbunden, während ihre kopf-ähnliche Struktur nur zeitweise an der B-Röhre des benachbarten Doppelmikrotubulus bindet. Eine ATP-abhängige Reaktion am so genannten „P1-loop“ der schweren Dyneinketten bewirkt eine Konformationsänderung des Dyneinkopfs. Diese wiederum verursacht eine Verschiebung der benachbarten Doppelmikrotubuli in die entgegengesetzte Längsrichtung und vermittelt dadurch die Zilienbewegung.

### Evolutionäre Konservierung

Zilien und Geißeln (Flagellen) gehören aus evolutionärer Sicht zu den ältesten Strukturen pflanzlichen und tierischen Lebens. Zahlreiche Erkenntnisse zur Geißel- und Zilienfunktion wurden in der Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* generiert [9]. Die inneren und äußeren Dyneinarme sind große Multiproteinkomplexe, welche aus schweren (Molekulargewicht: 400.000–500.000), mittelschweren (Molekulargewicht: 55.000–110.000) und leichten (Molekulargewicht: 8000–45.000) Dyneinketten bestehen. Der äußere Dyneinarm setzt sich vermutlich aus 3 schweren (HC), 2 mittelschweren (IC) und 8 leichten Ketten (LC) zusammen. Die meisten Proteine des äußeren Dyneinarm („outer dynein arm“, ODA)-Komplexes der Grünalge *Chlamydomonas* sind bekannt (■ Abb. 3). Mutationen in den für diese Strukturproteine kodierenden *Chlamydomonas*-Genen verursachen ODA-Defekte und eine verminderte Geißelbeweglichkeit.

#### ■ Elektronenmikroskopische Untersuchungen des respiratorischen Epithels von PCD-Patienten zeigen häufig Defekte ziliärer Strukturen.

Nur bei einem kleinen Teil der Betroffenen (<5%) sind keine ultrastrukturellen Defekte nachweisbar, d. h. in diesen Fällen kann die Elektronenmikroskopie die

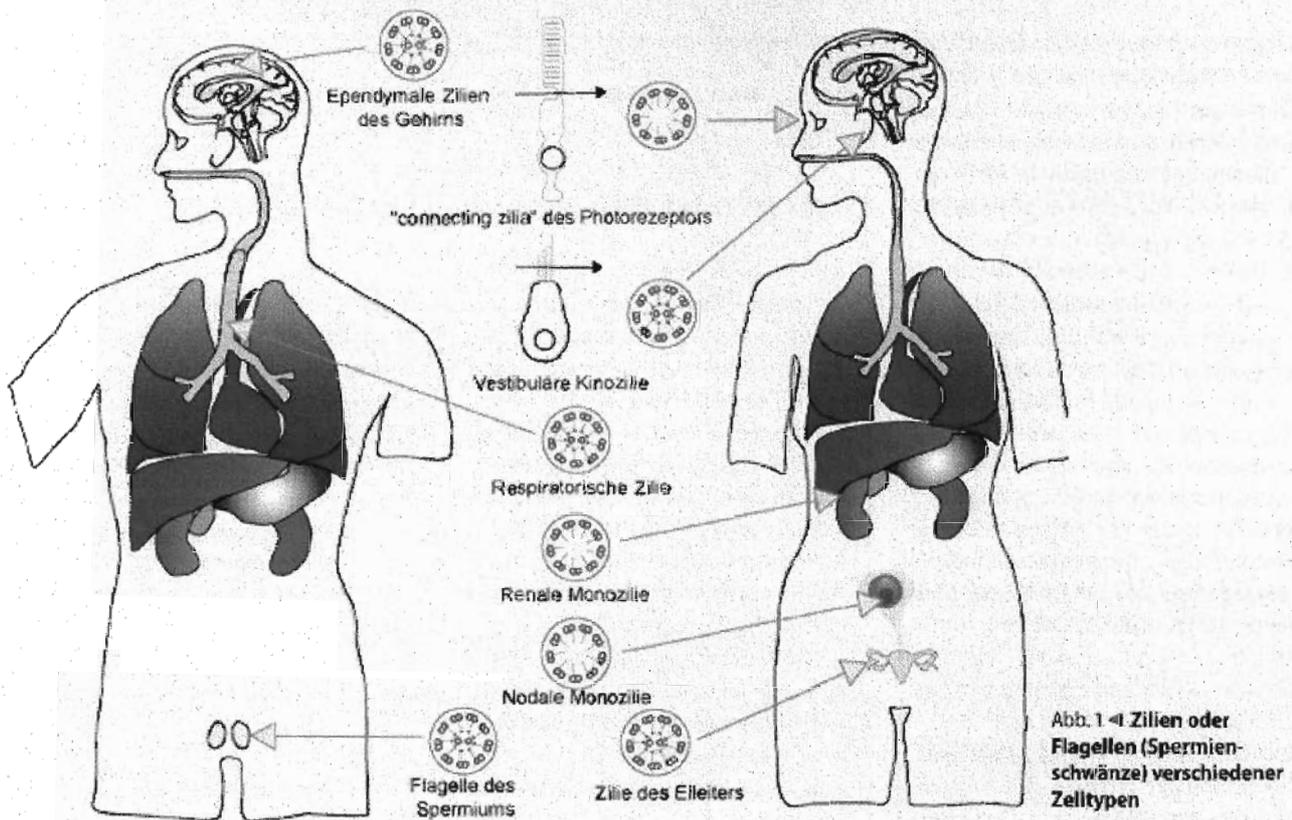


Abb. 1 ◀ Zilien oder Flagellen (Spermien-schwänze) verschiedener Zelltypen

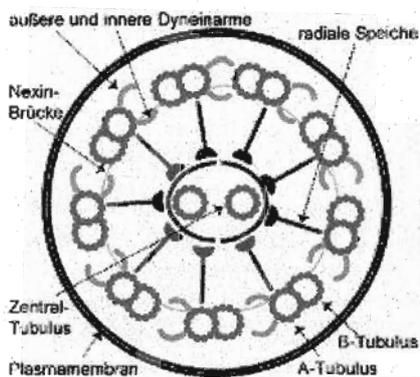


Abb. 2 ▲ Schematische Darstellung eines Zilienquerschnitts, peripher: 9 Doppelröhren, jeweils bestehend aus einem A- und einem B-Tubulus, Zentrum: 2 singuläre Mikrotubuli, Dyneinarme sind stets an der A-Röhre verankert

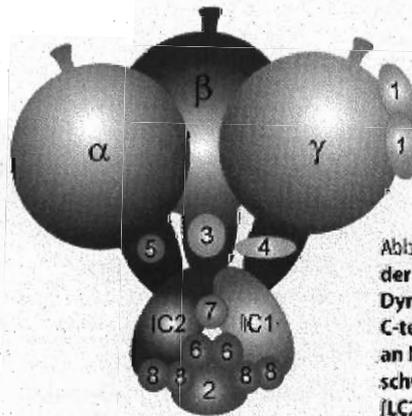


Abb. 3 ◀ Modell des äußeren Dyneinarms der *Chlamydomonas*-Alge: 3 schwere Dyneinketten (α-, β- und γ-HC) mit großen C-terminalen kugelförmigen Motordomänen, an N-terminaler Stieldomäne binden mittel-schwere (IC1/IC2) und leichte Dyneinketten (LC2-8), leichte Kette 1 bindet an γ-HC

Diagnose nicht sichern. Ultrastrukturelle Defekte umfassen das Fehlen äußerer oder innerer Dyneinarme (~80% der Fälle), Defekte der radialen Speicher und Nexinverbindungen oder eine axonemale Disorganisation. Aufgrund dieser elektronenmikroskopischen Befunde speulierte Afzelius [2] bereits 1976, dass PCD wahrscheinlich durch Defekte der Dyneinstrukturen oder anderer ziliärer Strukturproteine ver-

ursacht wird. Deshalb erscheinen Gene, die für ziliäre Strukturproteine kodieren, als exzellente Kandidatengene für PCD.

### Genetische Defekte bei PCD

PCD ist eine genetisch heterogene Erkrankung, die in der Regel autosomal-rezessiv vererbt wird [10]. Für autosomal-rezessiv vererbte PCD-Varianten mit Defekten

des äußeren Dyneinarms wurden bislang 3 Genorte auf den Chromosomen 9p13-p21, 19q13.3-qter und 5p15-p14 lokalisiert [11-13]. Für 2 Genorte konnte das verantwortliche Gen identifiziert werden. Rezessive Mutationen in einem weiteren Gen (*DNAH12*) führen möglicherweise ebenfalls zu PCD. Selten wurden eine dominante oder X-chromosomal-rezessive Vererbung beobachtet.

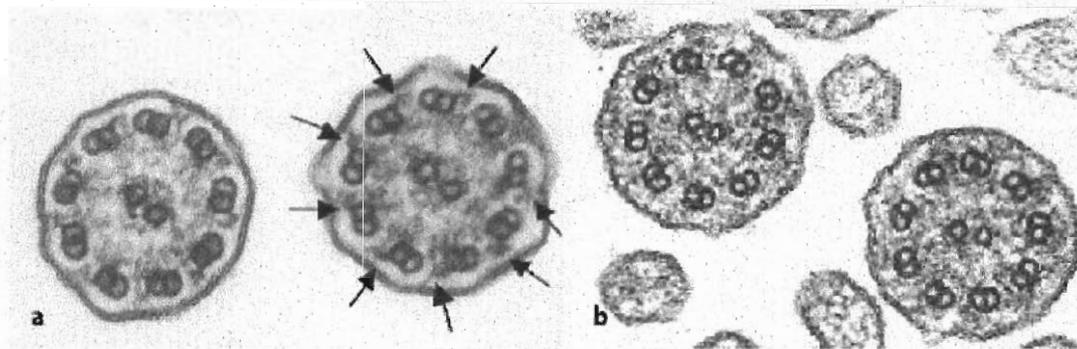


Abb. 4 ◀ Ultrastrukturelle Befunde respiratorischer Zilien, a normale Anatomie, Pfeile äußere Dyneinarme, b Fehlen aller äußeren Dyneinarme bei einem Patienten mit nachgewiesener homozygoter Loss-of-function-Mutation des *DNAH5*-Gens

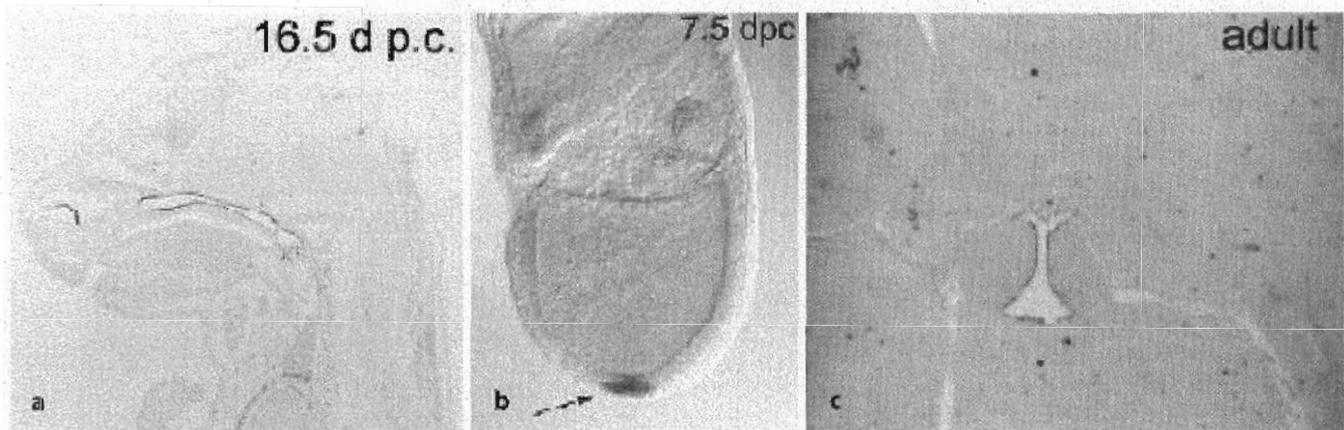


Abb. 5a-c ▲ Spezifische Expression des *DNAH5*-Mausgens (*DNAH5*) in a Zellen des Atemwegsepithels, b embryonalen Knoten, c Ependym, welches die inneren Hirnwasserräume auskleidet – diese Zelltypen tragen bewegliche Zilien

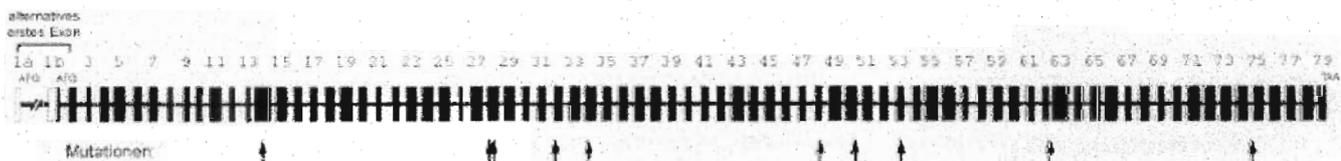


Abb. 6 ▲ Intron-Exon-Struktur des *DNAH5*-Gens und Darstellung aller bislang bei PCD-Patienten publizierten Mutationen

## *DNAI1*

Das Gen *DNAI1* kartiert auf Chromosom 9p13-p21 und kodiert für ein aus 699 Aminosäuren bestehendes Protein, welches hohe Homologien zur *Chlamydomonas*-IC1-Dyneinkette des äußeren Dyneinarms (▣ Abb. 3) aufweist. Mittels Northern-Blot-Analyse konnte ein spezifisches Transkript in Trachea und Testis nachgewiesen werden [11], was zu einer Expression in respiratorischem Epithel und Spermien passt.

- *DNAI1*-Mutationen verursachen PCD mit Defekten des äußeren Dyneinarms (▣ Abb. 4), eine Randomisierung der Links-rechts-

Körperasymmetrie sowie männliche Infertilität [11, 14].

Selten konnten Keimbahnmutationen im *DNAI1*-Gen nachgewiesen werden [15]. Von 121 PCD-Patienten, die auf das Vorliegen von *DNAI1*-Mutationen untersucht wurden, waren 14% *DNAI1*-Mutationsträger ( $n=17$ ). 15 mutierte Allele entfielen auf die *DNAI1*-Mutation (219+3insT) [16]. Aus diesem Grund erscheint ein systematisches Screening auf das Vorliegen dieser Mutation bei PCD-Patienten sinnvoll. Weitere Analysen zeigten, dass deutsche PCD-Betroffene ( $n=56$ ) die 219+3insT-Mutation nicht aufwiesen (unveröffentlichte Daten des Verfassers), interessanterweise wurde jedoch die 219+3insT-Mutation in 2 briti-

schen Familien gefunden. Wahrscheinlich handelt es sich bei dieser um eine Founder(Gründer)-Mutation, die bevorzugt in der französischen, englischen und amerikanischen PCD-Population zu finden ist.

## *DNAH5*

Mit Hilfe einer Homozygotiekartierungsstrategie konnte bei einer großen konsanguinen PCD-Familie eine Region vereinbar mit Vererbung durch gemeinsame Abstammung („homozygosity by descent“) auf Chromosom 5p14-p15 identifiziert werden. Die Kopplungsanalyse erbrachte für diesen Genort einen signifikanten LOD-Score von  $Z(\max)=3,51$  [13]. Innerhalb der kritischen genetischen Region auf Chromo-

## Exon50 → 8440-8477 delGAACCAA

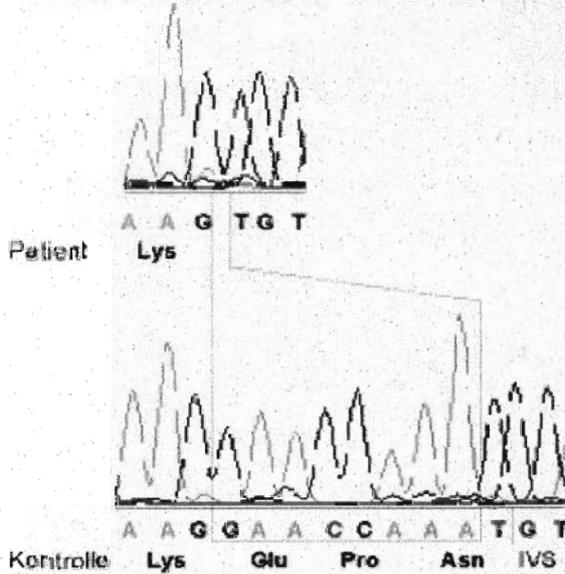


Abb. 7 ▶ Sequenzanalyse bei einer Patientin mit immotilen Zilien mit homozygoter DNAH5-Mutation

som 5p14-p15 konnte ein Gen (*DNAH5*) lokalisiert werden, das für ein Protein kodiert, welches eine hohe Homologie zur schweren axonemalen  $\gamma$ -Dyneinkette der Grünalge *Chlamydomonas* aufweist. Mutationen schwerer axonemaler Dyneinketten führen bei *Chlamydomonas* zur Dysmotilität der Algenschwänze. Elektronenmikroskopisch ist bei diesen Algen ein Verlust der äußeren Dyneinarme nachweisbar.

Das Expressionsmuster von *DNAH5* passt zum PCD-Phänotyp: Expressionsanalysen des Mausorthologs (*DNAH5*) zeigten eine spezifische Expression in Zilien tragenden Geweben wie respiratorischem Epithel der Atemwege, embryonaler Knoten und Hirnpendym (Abb. 5).

Aufgrund der chromosomalen Lokalisation, der funktionellen Bedeutung des *Chlamydomonas*-Orthologs und der Expressionsanalysen wurde *DNAH5* als aussichtsreiches Kandidatengen für PCD eingestuft [13].

Aufgrund der Größe des *DNAH5*-Gens waren molekulargenetische Analysen sehr aufwändig. Es besteht aus 79 Exons und einem alternativem ersten Exon (Abb. 6). Das Transkript ist 13.872 Nukleotide lang, die für ein Protein, bestehend aus 4624 Aminosäuren, kodieren.

— Mutationsanalysen zeigten, dass rezessive Mutationen des *DNAH5*-Gens PCD mit Defekten des äußeren

Dyneinarms und Randomisierung der Links-rechts-Körpersymmetrie verursachen.

Bei 8 von 25 PCD-Familien, welche eine Kopplung zum 5p-Locus aufwiesen, war der Nachweis von Mutationen möglich [17]. Die detektierten Mutationen führen zumeist zu einem vorzeitigen Abbruch der Translation aufgrund des Auftretens eines vorzeitigen Stoppkodons. Es handelte sich also bei den meisten Mutationen um so genannte Loss-of-function-Mutationen (Abb. 7).

Des Weiteren wurden obligatorische Spleißstellenmutationen und Mutationen, die einen nichtkonservativen Aminosäureaustausch bewirken, identifiziert. Der hohe Anteil von Mutationsträgern bei untersuchten PCD-Patienten weist darauf hin, dass *DNAH5*-Mutationen in vielen Fällen für die Erkrankung verantwortlich sind. Eine aktuelle Untersuchung an einer großen Patientenkohorte ( $n=86$ ) bestätigte diese Ergebnisse (unveröffentlichte Daten).

### DNAH11

Es kartiert auf Chromosom 7p15.3-21 und kodiert ebenfalls für eine axonemale schwere Dyneinkette [18]. Es besteht aus 82 Exons. Das orthologe Mausgen (*Ird*) ist bekannt. Rezessive Missense-Mutatio-

nen in diesem Gen führen im *in vivo* (*Inversum viscerum*)-Mausmodell zu Randomisierung der Links-rechts-Körpersymmetrie durch immotile Zilien am embryonalen Knoten. Molekulargenetische Untersuchungen bei einem Patienten mit Mukoviszidose (homozygote *cftr*-Mutation) und Situs inversus zeigten eine uniparentale Isodisomie für Chromosom 7; die Mutationsanalyse des *DNAH11*-Gens konnte eine homozygote Nonsense-Mutation (c.8554C → T; R2852X) im Exon 52 nachweisen. Da elektronenmikroskopische Untersuchungen der respiratorischen Zilien unauffällig waren, konnte bei diesem Patienten PCD nicht mit letzter Sicherheit bestätigt werden. Sequenzanalysen bei weiteren PCD-Patienten identifizierten keine zusätzlichen Mutationen.

Aufgrund dieser Daten ist anzunehmen, dass *DNAH11*-Mutationen einen Situs inversus verursachen können. Inwieweit dieses Gen auch für PCD verantwortlich ist, müssen zukünftige Analysen zeigen.

### RPGR

Retinitis pigmentosa ist das bekannteste und häufigste Krankheitsbild der hereditären Netzhaut-Aderhaut-Dystrophien. In 15-20% der Fälle sind *RPGR*-Mutationen für diese Erkrankung verantwortlich. Sie verursachen eine X-chromosomal-rezessive vererbte Retinitis pigmentosa. In Einzelfällen wurden bei männlichen Patienten mit Retinitis pigmentosa und nachgewiesenen *RPGR*-Mutationen typische Symptome einer PCD beobachtet [19, 20, 21, 22]. Die Diagnose einer PCD konnte durch den spezifischen Nachweis ultrastruktureller Defekte respiratorischer Zilien bestätigt werden. Einige der Betroffenen wiesen zudem eine Innenohrschwerhörigkeit auf.

### Nachweis von Defekten mittels Immunfluoreszenzmikroskopie

Mittels hoch auflösender Immunfluoreszenzmikroskopie (IF, Abb. 8) lassen sich schon jetzt Defekte des äußeren Dyneinarms (häufigster PCD-Defekt) anhand von Atemwegsepithel sicher nachweisen (persönliche Daten). Das Material wird durch transnasale Bürstung, welche nur eine geringe Belastung für den Patienten bedeutet, gewonnen. Dieses neue Verfah-

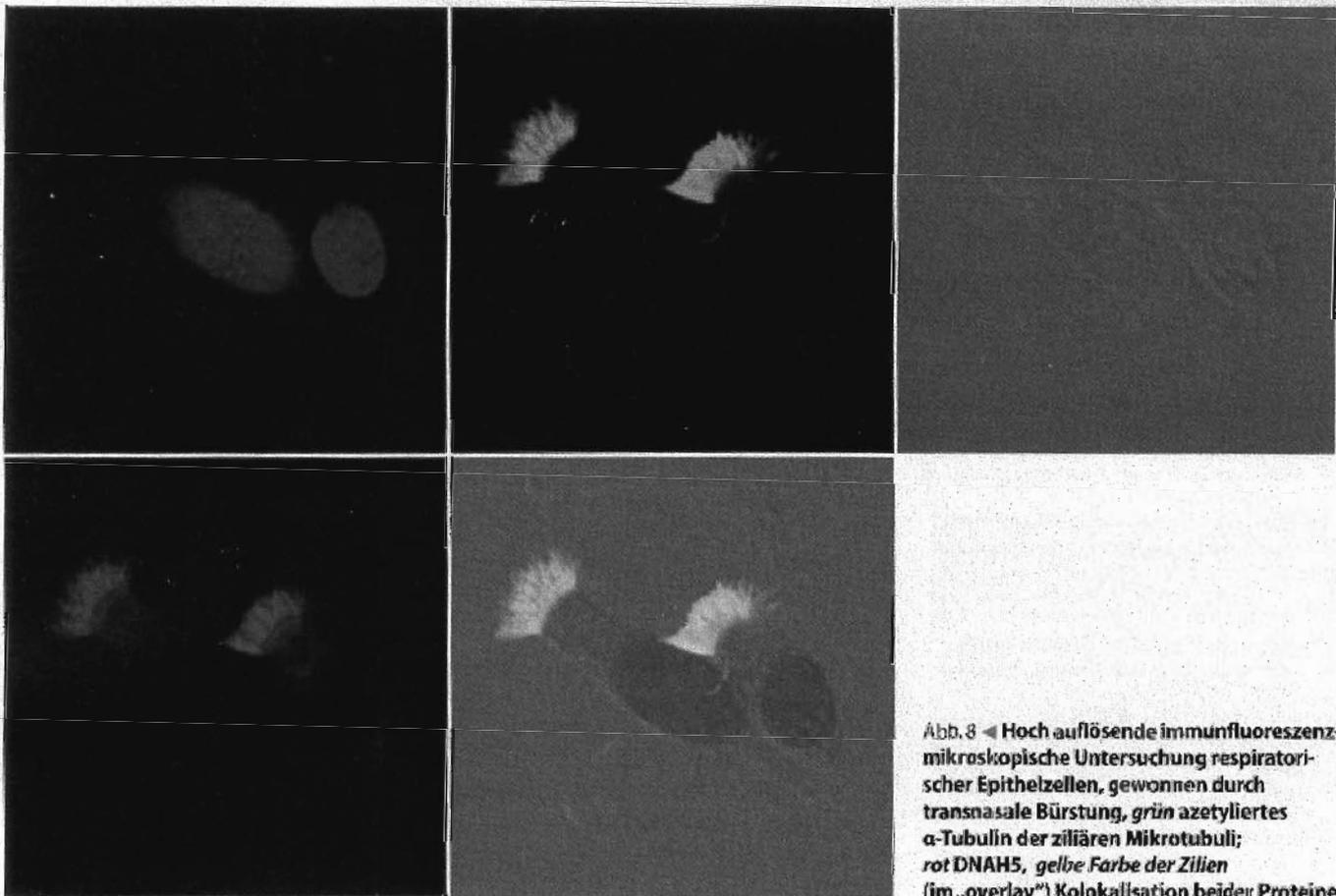


Abb. 8 ◀ Hoch auflösende immunfluoreszenzmikroskopische Untersuchung respiratorischer Epithelzellen, gewonnen durch transnasale Bürstung, grün azetyliertes  $\alpha$ -Tubulin der ziliären Mikrotubuli; rot DNAH5, gelbe Farbe der Zilien (im „overlay“) Kolokalisation beider Proteine

ren hat den Vorteil, dass in vielen Fällen die belastende Zangenbiopsie zur Entnahme von Gewebe zur elektronenmikroskopischen Untersuchung vermeidbar ist. Aktuell können damit noch nicht alle ultrastrukturell detektierbaren PCD-Defekte nachgewiesen werden. Defekte des inneren Dyneinarms sind wahrscheinlich in naher Zukunft ebenfalls mittels Immunfluoreszenzmikroskopie nachweisbar, sodass dann mittels IF in mehr als 80% der Fälle die Diagnose PCD bestätigt werden kann.

## Fazit

Mittels molekulargenetischer Untersuchungen wurden bereits mehrere genetische Defekte bei PCD identifiziert, deshalb kann in einem zunehmenden Anteil von Patienten die Diagnose molekulargenetisch gesichert werden.

Studien zur Identifikation weiterer PCD-Gene werden fortgesetzt (<http://www.ukl.uni-freiburg.de/kinderkl/omran>). Die Identifikation verantwortlicher Gene hat zu einem besseren Verständnis der

Zilienfunktion geführt. Dieses Wissen ist die Basis zur Entwicklung neuer diagnostischer Verfahren, z. B. der heute bereits zur Detektion von Defekten des äußeren Dyneinarms eingesetzten hoch auflösenden Immunfluoreszenzmikroskopie. Defekte des inneren Dyneinarms sind wahrscheinlich bald ebenfalls mittels Immunfluoreszenzmikroskopie nachweisbar, sodass dann die Diagnose PCD mit dieser Methode in mehr als 80% der Fälle bestätigt werden kann.

## Korrespondierender Autor

PD Dr. H. Omran



Zentrum für Kinderheilkunde und Jugendmedizin, Universität Freiburg, Mathildenstraße 1, 79106 Freiburg  
E-Mail: [omran@kikli.ukl.uni-freiburg.de](mailto:omran@kikli.ukl.uni-freiburg.de)

## Danksagung

Für die langjährige Unterstützung des Forschungsprojekts gilt den Betroffenen und der Selbsthilfegruppe für „Primäre Ciliäre Dyskinesie

und Kartagener Syndrom e.V.“, wie auch allen zuzendenden Pädiatern ein herzlicher Dank. Der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG, Ori f/2) und Michael-Wagner-Stiftung „Kinderlachen“ gilt besonderer Dank für die Förderung des Projekts.

**Interessenkonflikt:** Der korrespondierende Autor versichert, dass keine Verbindungen mit einer Firma, deren Produkt in dem Artikel genannt ist, oder einer Firma, die ein Konkurrenzprodukt vertreibt, bestehen.

## Literatur

1. Ibanez-Tallon I, Heintz N, Omran H (2003) To beat or not to beat: roles of cilia in development and disease. *Hum Mol Genet* 12:R27–R35
2. Afzelius BA (1976) A human syndrome caused by immotile cilia. *Science* 193:317–319
3. Afzelius BA, Mossberg B (1995) Immotile cilia syndrome (primary ciliary dyskinesia) including Kartagener syndrome. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS (eds) *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. McGraw-Hill, New York, pp 3943–3954
4. Nonaka S, Tanaka Y, Okada Y et al. (1998) Randomization of left-right asymmetry due to loss of nodal cilia generating leftward flow of extraembryonic fluid in mice lacking KIF3B motor protein. *Cell* 95:829–837
5. Ibanez-Tallon I, Gorokhova S, Heintz N (2002) Loss of function of axonemal dynein Mdnah5 causes primary ciliary dyskinesia and hydrocephalus. *Hum Mol Genet* 11:715–721