

Ergebnisse

PCR-Optimierung

Die Optimierung der PCR wurde durchgeführt, um für die Primer jedes Exons die geeignetste Annealing Temperature sowie Zyklenzahl zu bestimmen. Getestet wurden Temperaturen zwischen 45 und 63 Grad Celsius sowie 37 bis 40 Zyklen.

Das Exon 27 ließ sich mit einer herkömmlichen Taq-Polymerase nur unzureichend amplifizieren. Daher wurde in einem zweiten Versuch eine hochspezifische High Fidelity Taq-Polymerase verwendet.

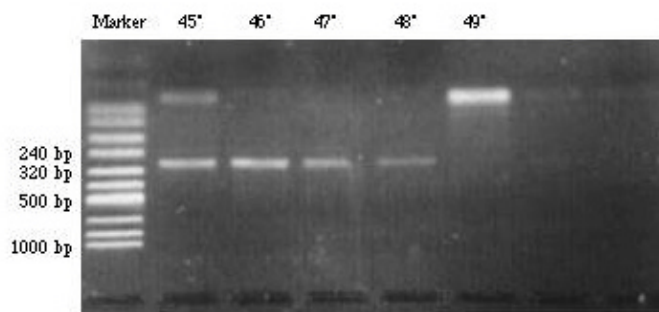


Abbildung 6: PCR Exon 27

Unter Benutzung der herkömmlichen Taq-Polymerase fällt das PCR-Produkt schwach aus. Man erkennt unspezifische Nebenbanden und zu schwache Hauptbanden. Das PCR-Produkt umfaßt 240 bis 320 Basenpaare. Dies entspricht der erwarteten Größe.

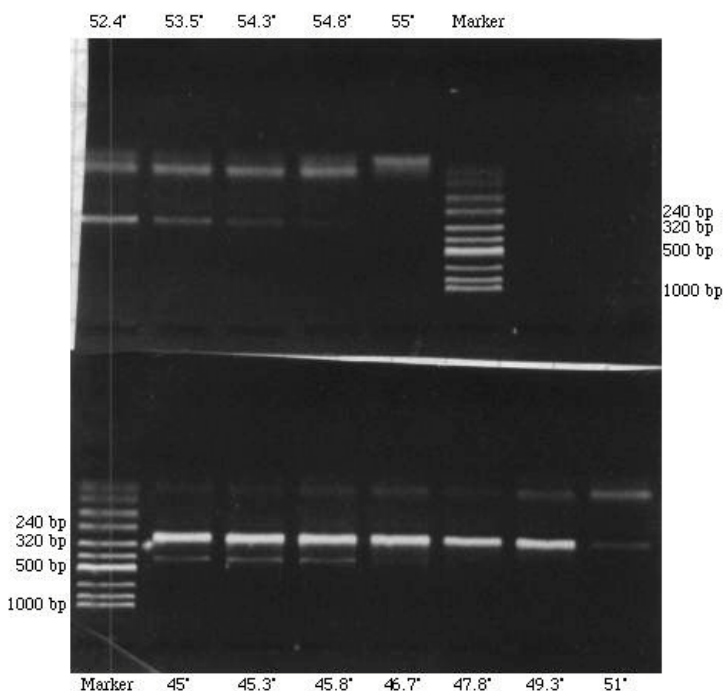


Abbildung 7: PCR Exon 27

Unter Benutzung der High-Fidelity Taq-Polymerase sind die Hauptbanden stärker, und es treten weniger starke Nebenbanden auf. Verwendet wurden 49°C bei 37 Zyklen. Außerdem wurde die Primermenge von 1 ml auf 0,8 ml reduziert.

Sämtliche anderen Exons konnten mit der herkömmlichen Taq-Polymerase bei höheren Temperaturen amplifiziert werden. Exon 28 wies bei allen Temperaturen eine gleichbleibende Spezifität der PCR auf. Es wurden 55°C als Optimum ausgewählt.

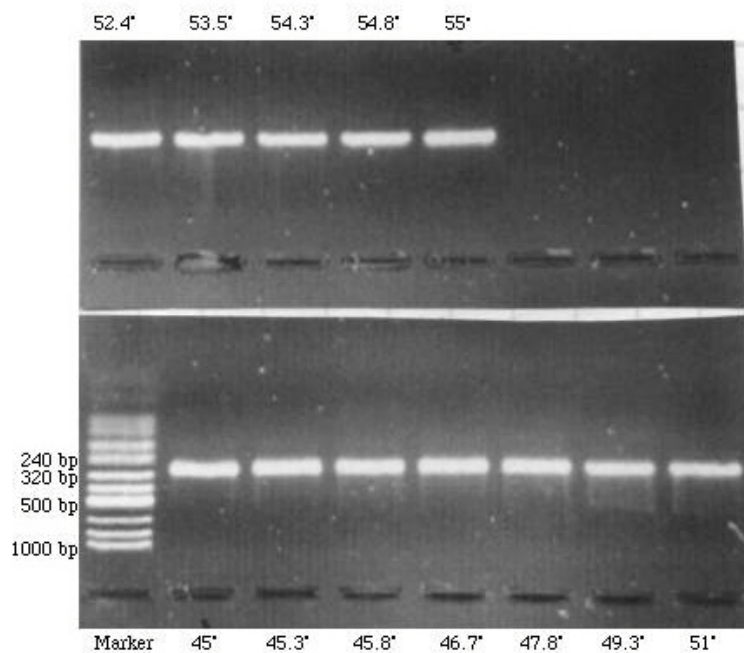


Abbildung 8: PCR Exon 28

Es treten starke Hauptbanden auf. Nebenbanden sind nicht zu erkennen. Verwendet wurden 55°C bei 40 Zyklen. Das PCR-Produkt umfaßt 240 bis 320 Basenpaare. Dies entspricht der erwarteten Größe.

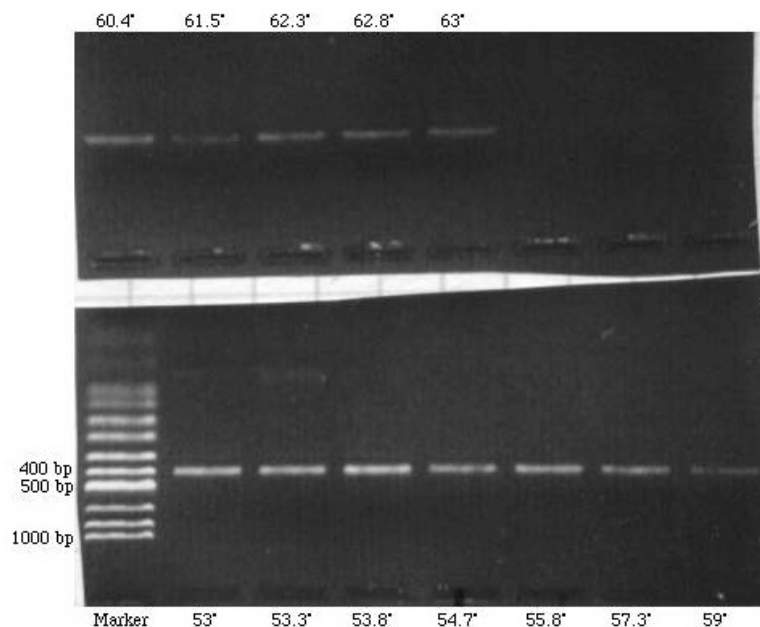


Abbildung 9: PCR Exon 29

Verwendet wurden 55°C bei 40 Zyklen. Höhere Temperaturen waren ungeeignet, da die Banden zu schwach waren. Das PCR-Produkt umfaßt 400 bis 500 Basenpaare. Dies entspricht der erwarteten Größe.

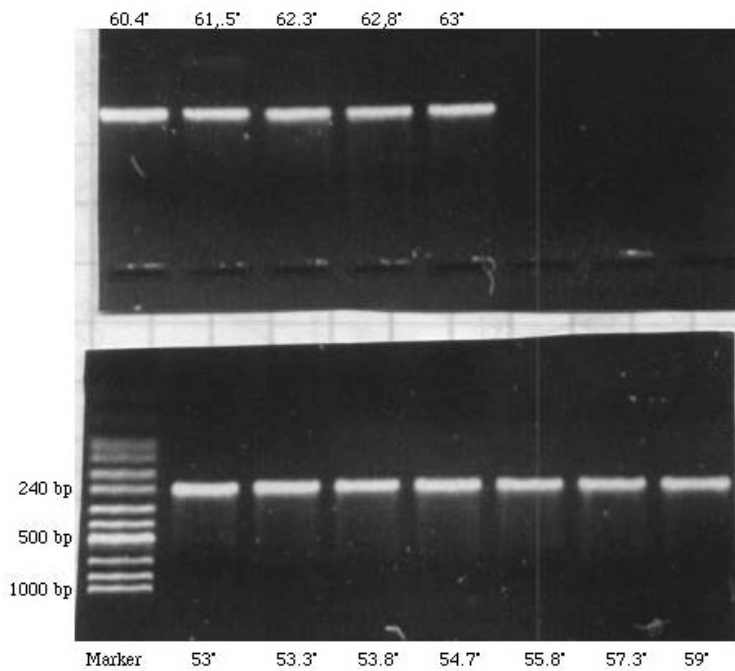


Abbildung 10: PCR Exon 30

Es treten starke Hauptbanden auf. Nebenbanden sind nicht zu erkennen. Nebenprodukte sind nicht zu erkennen. Ausgewählt wurden 63°C bei 35 Zyklen. Das PCR-Produkt umfaßt ca. 240 Basenpaare. Dies entspricht der erwarteten Größe.

Die Exons 31 und 32 wurden als gemeinsames Produkt amplifiziert, da sie sehr dicht auf dem Gen zusammen liegen. Das gemeinsame PCR-Produkt ist etwa 380 Basenpaare lang.

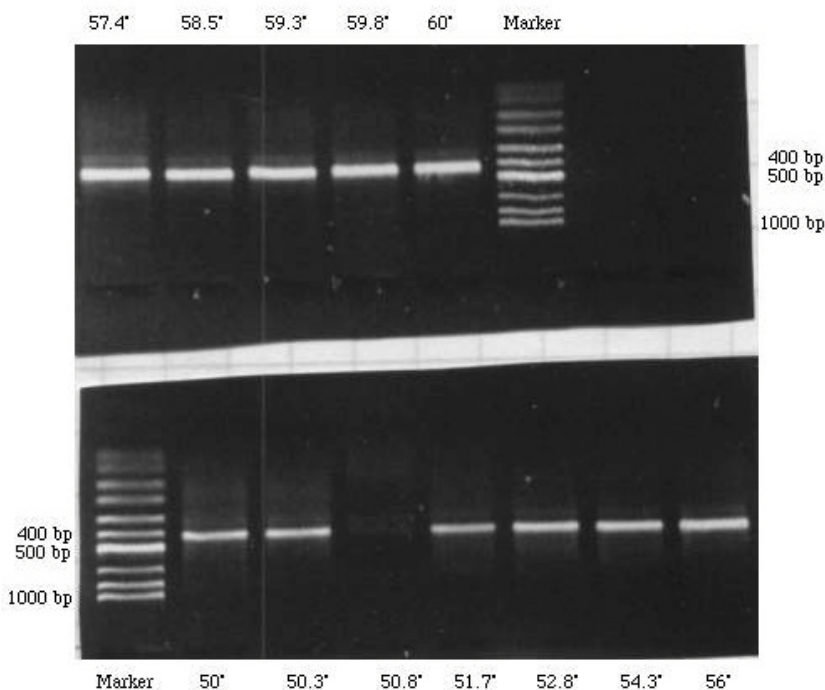


Abbildung 11: PCR Exons 31/32

Verwendet wurden 60°C und 38 Zyklen. Die PCR in der Spur bei 58,8°C hat nicht funktioniert. Das PCR-Produkt umfaßt 400 bis 500 Basenpaare. Dies entspricht der erwarteten Größe.

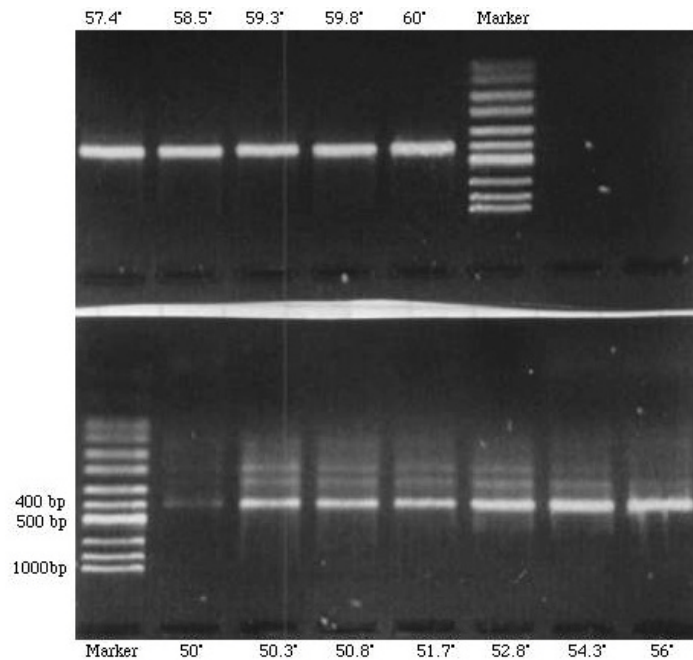


Abbildung 12: PCR Exon 33

Verwendet wurden 60°C bei 40 Zyklen. Bei 60°C ist das PCR-Produkt frei von Nebenbanden. Das PCR-Produkt umfasst 400 bis 500 Basenpaare. Dies entspricht der erwarteten Größe.

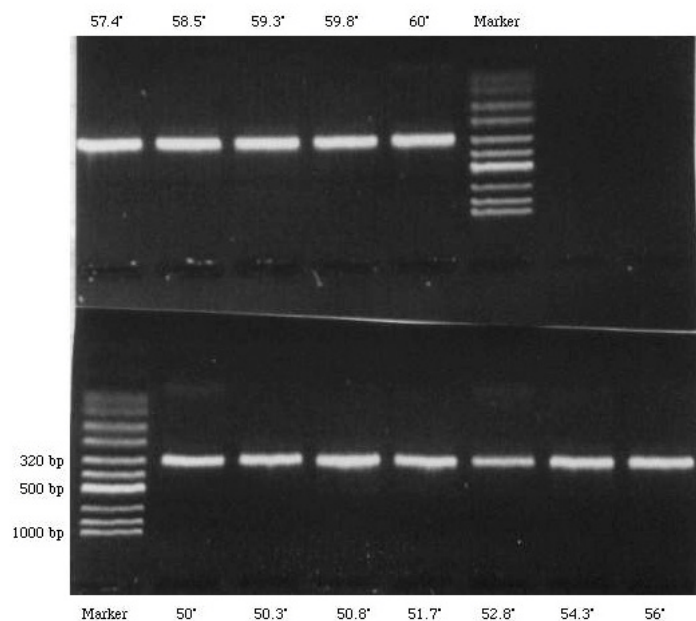


Abbildung 13: PCR Exon 34

Verwendet wurden 60°C und 35 Zyklen. Das PCR-Produkt umfasst ca. 320 Basenpaare. Dies entspricht der erwarteten Größe.

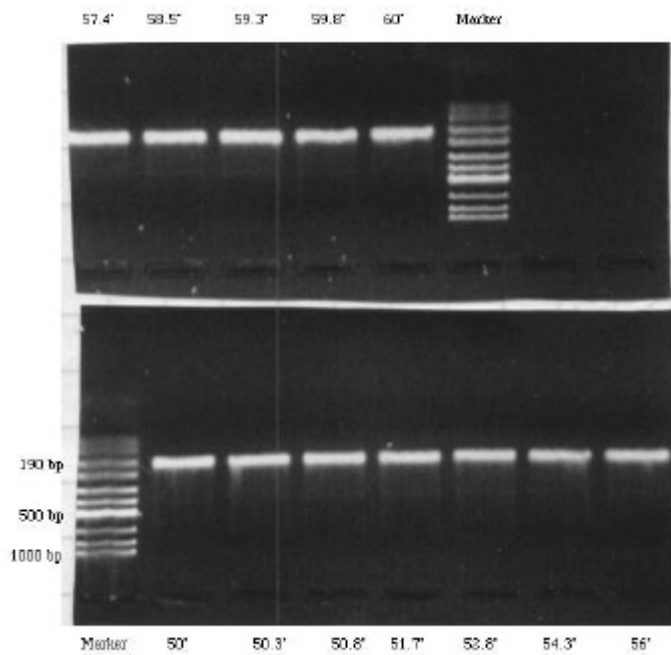


Abbildung 14: PCR Exon 35

Verwendet wurden 60°C bei 40 Zyklen. Das PCR-Produkt umfasst ca. 190 Basenpaare. Dies entspricht der erwarteten Größe.

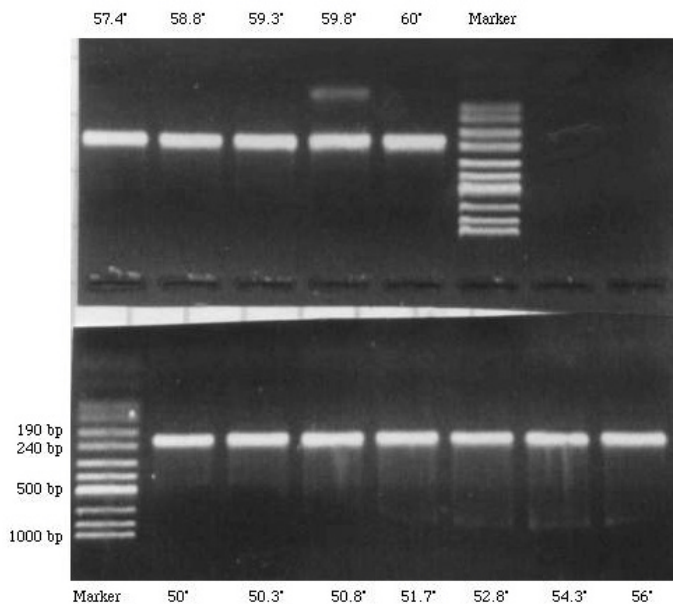


Abbildung 15: PCR Exon 36

Bei 59,8° findet sich ein unspezifisches Nebenprodukt. Da jedoch im Allgemeinen die PCR bei hohen Temperaturen spezifischer ist als bei niedrigen, wurden 60° bei 35 Zyklen verwendet. Das PCR-Produkt umfasst 190 bis 240 Basenpaare. Dies entspricht der erwarteten Größe

SSCP und Sequenzierung der Exons 27 bis 36

Exon 27

Bei der SSCP von Exon 27 wurden ein FA-Gel sowie ein MDE-Gel verwendet. Die Laufzeit betrug jeweils 40 Minuten. Es zeigten sich keine Bandenmuster als auffällig in den untersuchten Proben.



Abbildung 16: SSCP Exon 27

10% FA- Gel, 4°C, 40 Min.

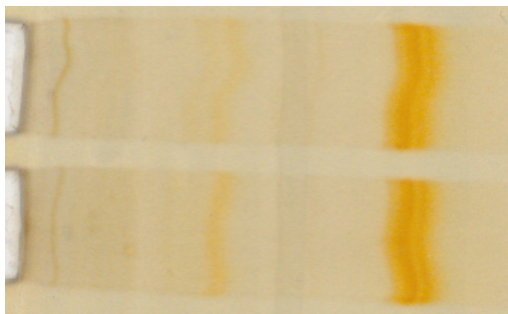


Abbildung 17: SSCP Exon 27; 2. Bedingung

MDE-Gel, 20°C, 40 Min.

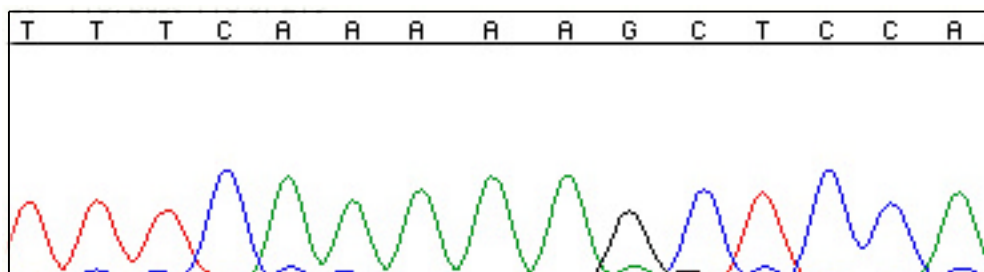


Abbildung 18: Sequenzierung Exon 27

Exon 28

Die SSCP von Exon 28 zeigte ein wiederkehrendes Muster mit jeweils zwei auffälligen Banden. Diese Musterverteilung läßt auf einen Polymorphismus schließen.

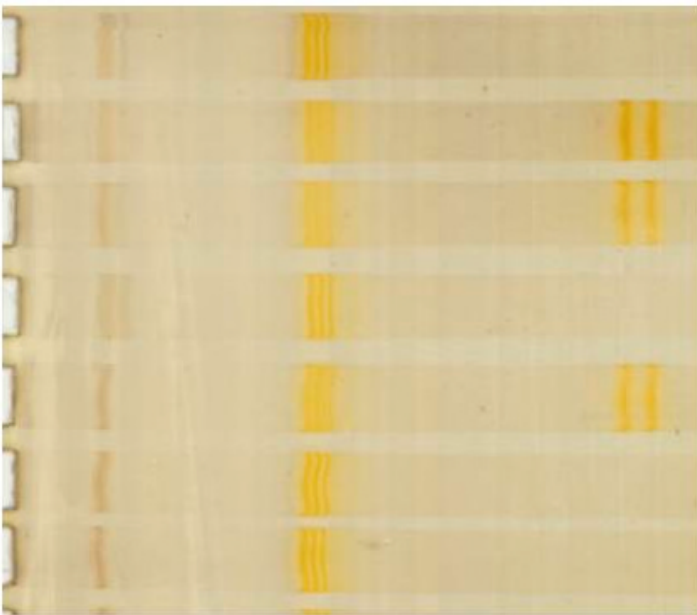


Abbildung 19: SSCP Exon 28

10% FA-Gel, 20°C, 60 Min.
Man erkennt ein häufiges Auftreten
der auffälligen Bandenmuster.

Auch in der 2. Gellaufbedingung erkennt man bei den gleichen Proben ein typisches, wiederkehrendes Muster.

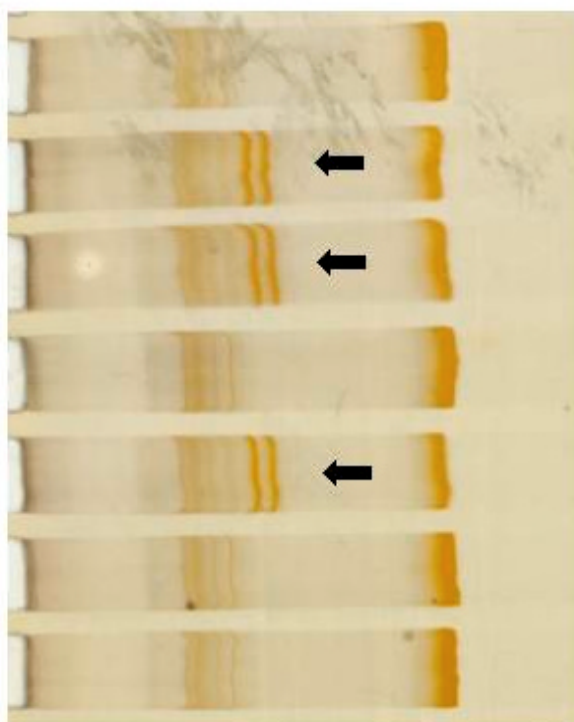


Abbildung 20: SSCP Exon 28

10% PAA-Gel, 10°C, 60 Min.
Auch in der 2. Bedingung erkennt man
die auffälligen Banden.

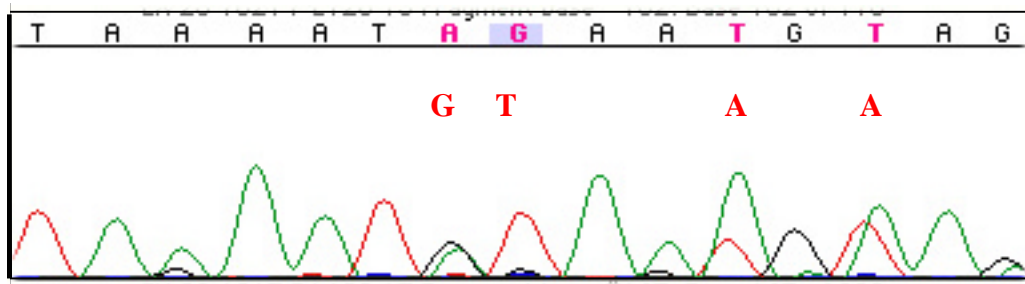


Abbildung 21: Sequenzierung Exon 28: Polymorphismus

Die hervorgehobenen Stellen bezeichnen die polymorphen Basen.

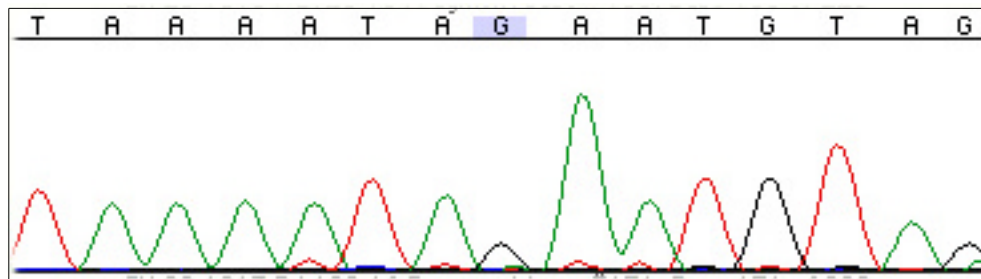


Abbildung 22: Sequenzierung Exon 28: Wildtyp

Die Sequenzierung zeigt bei den in der SSCP auffälligen Proben einen Polymorphismus in der Intronsequenz. Die markierten Positionen in Abbildung 21 zeigen vier Basenaustausche an. Leider befanden sich diese Basenpaare am Ende des sequenzierten PCR-Produkts, so daß nur der Vorwärtsstrang der Sequenzierung verwertbar war. Daher kann die Richtigkeit des gefundenen Ergebnisses nicht zweifelsfrei geklärt werden.

Exon 29

Zur SSCP von Exon 29 wurden ein PAA- sowie ein FA-Gel verwendet. Die SSCP ergab keine auffälligen Bandenmuster in allen Proben.

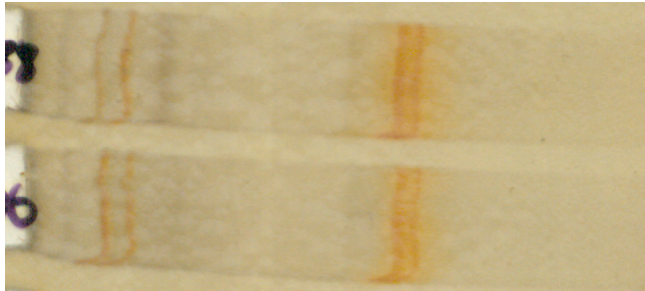


Abbildung 23: SSCP Exon 29

10%FA, 20°C, 60 Min.

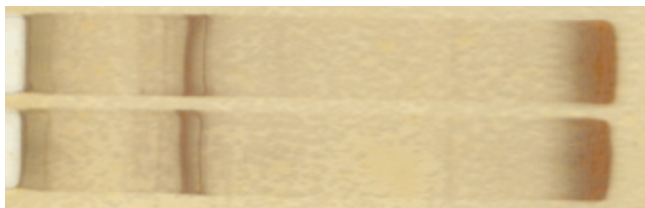


Abbildung24: SSCP Exon 29

10%PAA, 10°C, 60 Min

Die Wildtyp-Sequenz konnte in der Sequenzierung bestätigt werden. Ansonsten ergaben sich auch in der Sequenzierung keine auffälligen Basen.

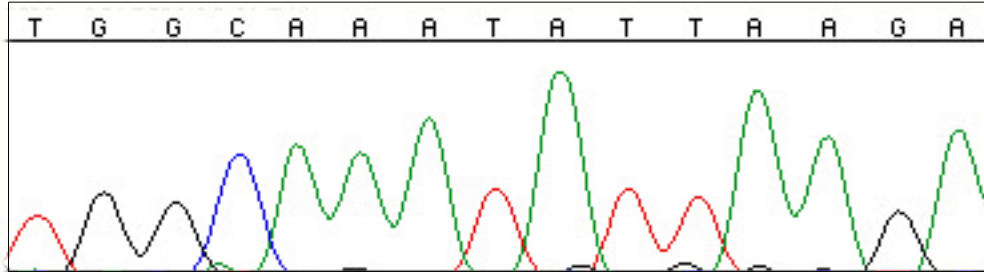


Abbildung 25: Sequenzierung Exon 29

Exon 30

Die SSCP von Exon 30 war bei zwei Proben auffällig. Dabei war die auffällige Bande jeweils in einem der beiden Gele besser zu erkennen als in dem anderen. Dies spricht für den Vorteil einer SSCP mit zwei Laufbedingungen



Abbildung 26: Exon 30:

1. auffällige SSCP

10%PAA, 4°C, 60 Min.
Die auffällige Probe war in dieser Laufbedingung besser zu erkennen.

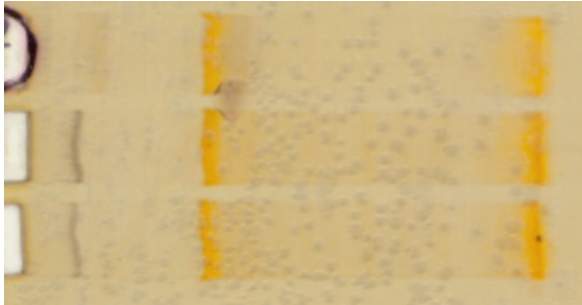


Abbildung 27: Exon 30; 1. auffällige SSCP; 2. Bedingung

10% FA, 20°C, 40 Min.

Auch die zweite auffällige Probe war in einem Gel nicht gut zu erkennen, im zweiten Gel, welches eine andere Zusammensetzung und Laufzeit hatte, konnte man einen deutlichen Unterschied sehen.



Abbildung 28: Exon 30; 2. auffällige SSCP; 1. Bedingung

10%PAA, 4°C, 60 Min.
Die auffällige Probe war in dieser Laufbedingung gut zu erkennen.

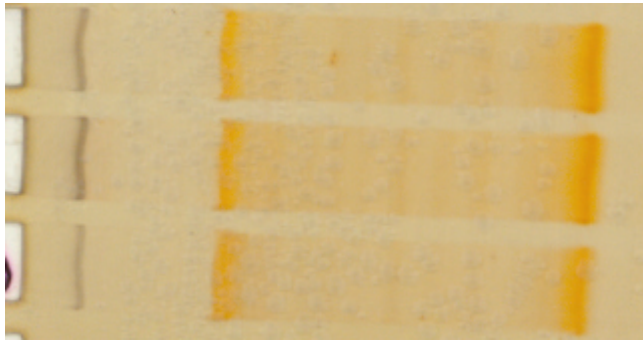


Abbildung 29: Exon 30; 2.auffällige SSCP; 2. Bedingung

10%FA, 20°C, 40 Min

Bei der Sequenzierung dieser auffälligen Proben zeigte sich jedoch kein Unterschied zur Wildtyp-DNA. Die Diskrepanz zwischen der auffälligen SSCP und der unauffälligen Sequenzierung erklärt sich wahrscheinlich durch die Fehleranfälligkeit der PCR.

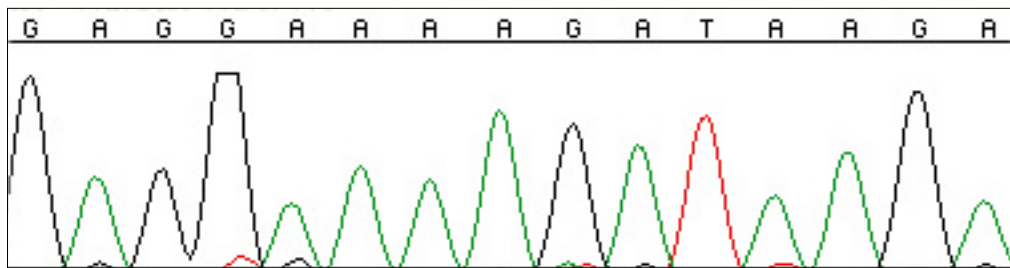


Abbildung 30: Sequenzierung Exon 30

Es sind keine Auffälligkeiten zu erkennen.

Exons 31 und 32

Die SSCP des PCR-Produkts der Exons 31 und 32 zeigte eine auffällige Probe, die nur bei einer Gellaufbedingung zu erkennen war.

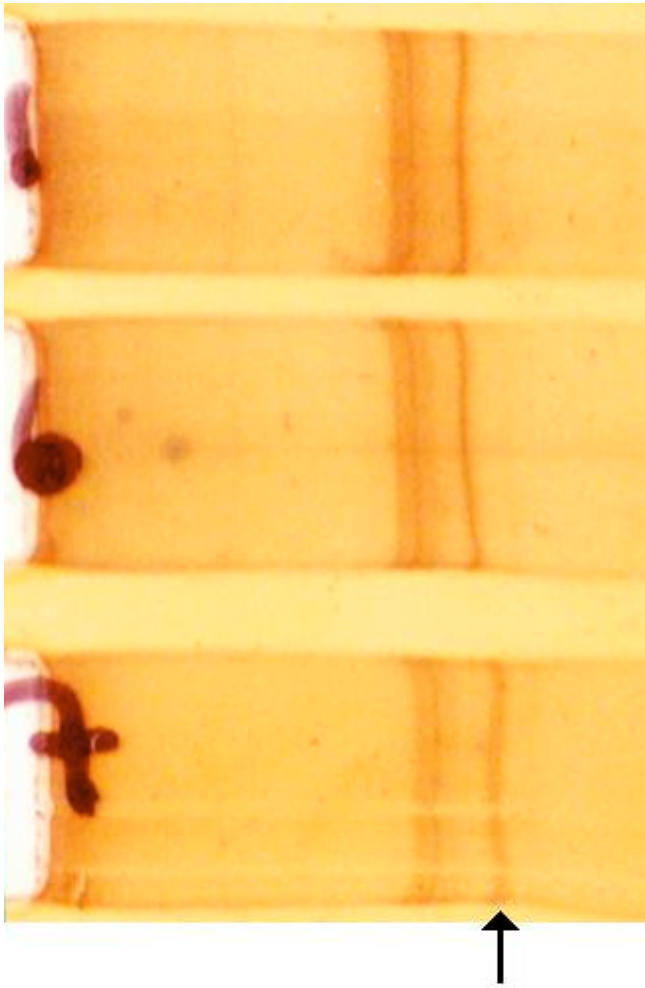


Abbildung 31: SSCP Exons 31/32

10%PAA, 10°C, 60 Min.
Die gekennzeichnete Bande ist etwas breiter, und sie ist weiter von den Hauptbanden entfernt als die Banden der anderen Proben.



Abbildung 32: SSCP Exons 31/32

MDE-Gel, 20°C, 60 Min.
Bei dieser Bedingung war das Bandenmuster der Probe unauffällig. Der Stern markiert die betreffende Probe.

Die Sequenzierung der Probe ergab einen Basenaustausch an einer Position. Zum Ausschluß eines Sequenzierungsfehlers wurde die Sequenzierung wiederholt. Erneut war der Basenaustausch zu erkennen. Wie auf der folgenden Abbildung zu erkennen ist, überlagern sich an der bezeichneten Position zwei unterschiedliche Basenpeaks. Dies zeigt das Vorhandensein einer Mutation auf einem der Allele an. Die genauere Analyse der von der Mutation betroffenen Codons zeigte, daß es sich um eine *Missense Mutation* handelt, die in einem Aminosäureaustausch von Valin zu Isoleucin resultiert.

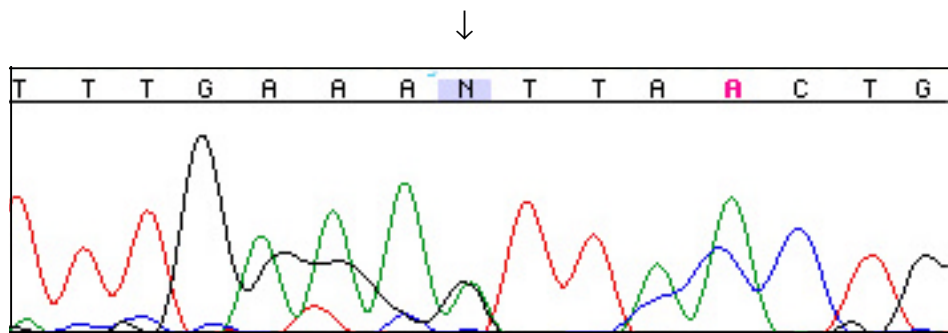


Abbildung 33: Sequenzierung Exon 32

Zwei Basen überlagern sich an der mit N bezeichneten Position. Es wurde auf einem der Allele ein G durch ein A ausgetauscht.

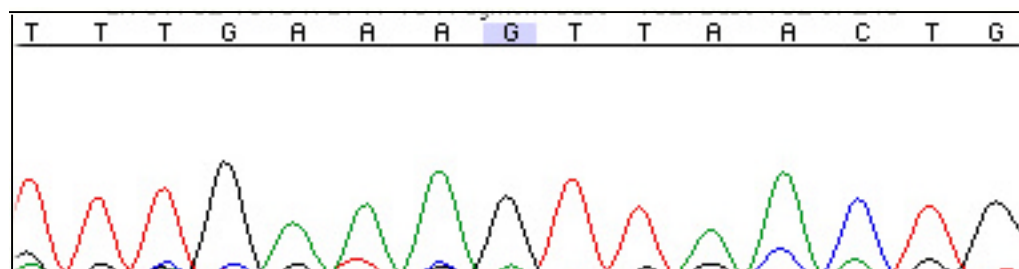


Abbildung 34: Sequenzierung Exon 32: Wildtyp

Die Sequenzierung einer Wildtypprobe zeigte an der entsprechenden Position ein G.

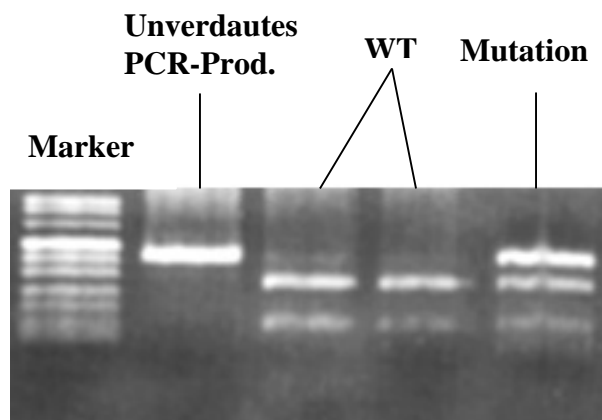


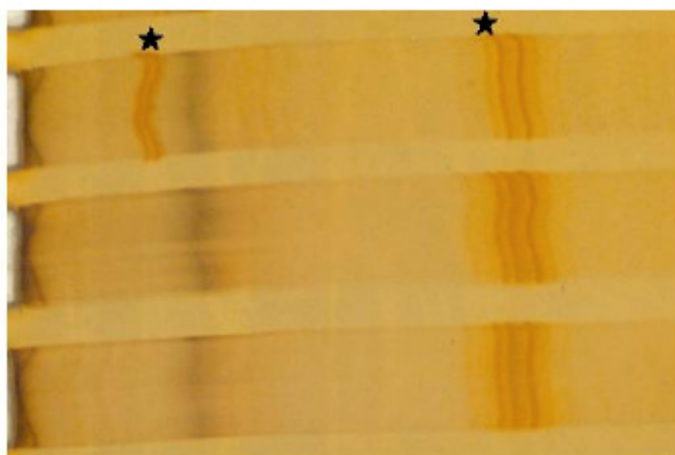
Abbildung 35: Restriktionsverdau der DNA mit der Mutation

Im Restriktionsverdau weist die mutierte Probe drei Banden auf, die beiden nebenstehenden Wildtypproben jedoch nur zwei Banden. Zum Vergleich wurden auch eine unverdaute Probe sowie der Marker aufgetragen. Es wurde das Restriktionsenzym HincII benutzt.

Um das Vorhandensein eines seltenen Polymorphismus auszuschließen, wurden eine Reihe von Kontrollproben mit dem gleichen Enzym (HincII) verdaut. Nach dem Verdau von 285 Blutspenderproben sowie 317 Proben aus einem Kollektiv von DCM-Patienten zeigte sich keine einzige Probe mit der gefundenen Mutation

Exon 33

Die SSCP von Exon 33 wurde mittels eines PAA-Gels und eines FA-Gels durchgeführt. Es gab insgesamt drei DNA-Proben, die in der SSCP auffällig waren.



Jedoch erwiesen sich diese Proben in der Sequenzierung als unauffällig.

Abbildung 36: SSCP Exon 33;

1. auffällige Probe

10% FA, 20°C, 42 Min.

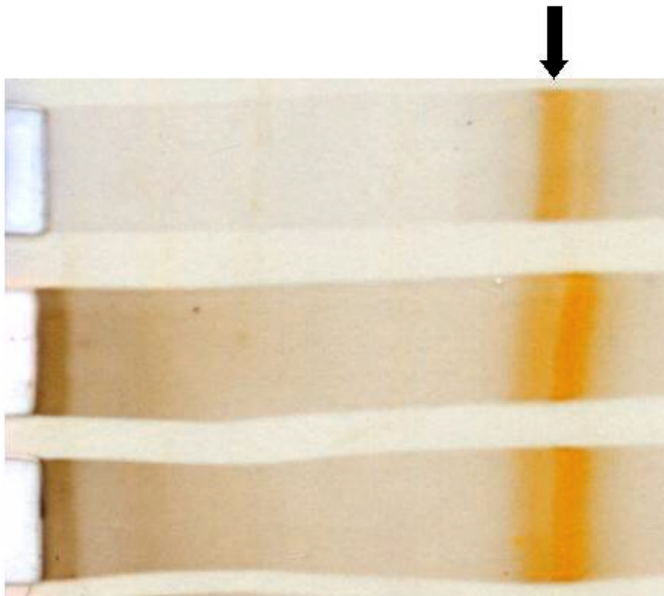
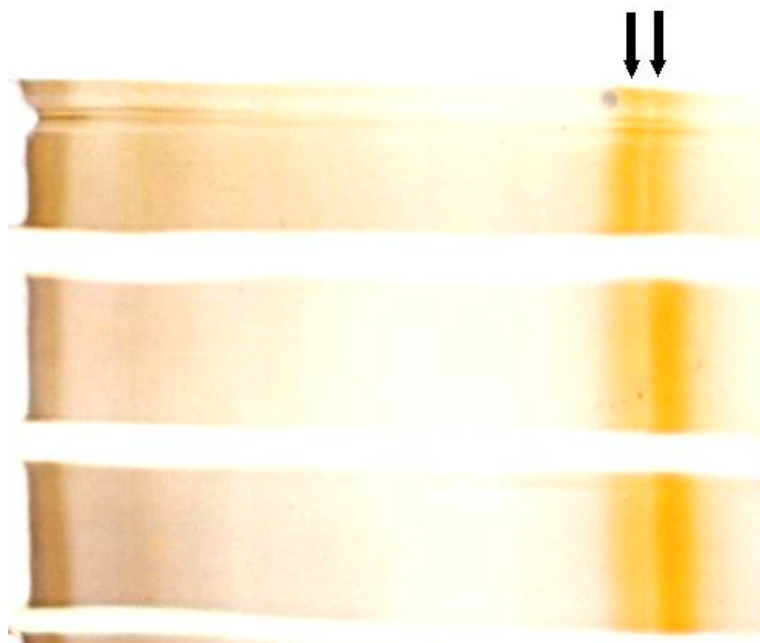


Abbildung 37: SSCP Exon 33;

2. auffällige Probe

6%PAA, 4°C, 45 Min.



**Abbildung 38: SSCP
Exon 33;**

3. auffällige Probe

6%PAA, 4°C, 45 Min.

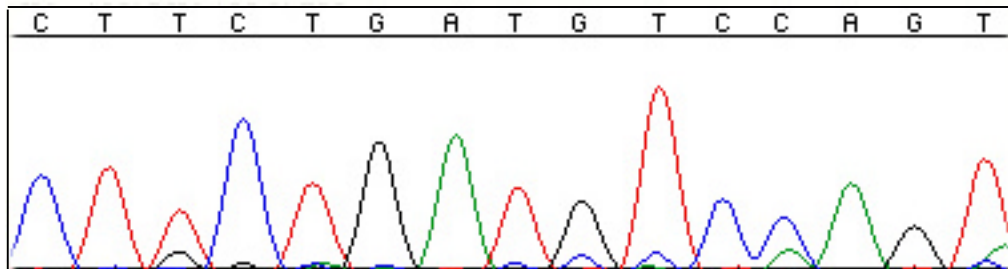


Abbildung 39: Sequenzierung Exon 33

Die Sequenzierung der auffälligen Proben zeigte keine abweichenden Basen. Es konnte ausschließlich die Wildtypsequenz bestätigt werden.

Exon 34

Bei der SSCP von Exon 34 fiel eine polymorphe Musterverteilung auf. Es wurden sechs verschiedene wiederkehrende Muster identifiziert. Diese zeichneten sich durch eine unterschiedliche Anzahl und Verteilung von Banden aus. Anders als bei der polymorphen Verteilung in Exon 28 gibt es kein überproportional häufig auftretendes Muster. Zur besseren Darstellung werden diese Bandenmuster vergrößert und schwarz/weiß dargestellt.

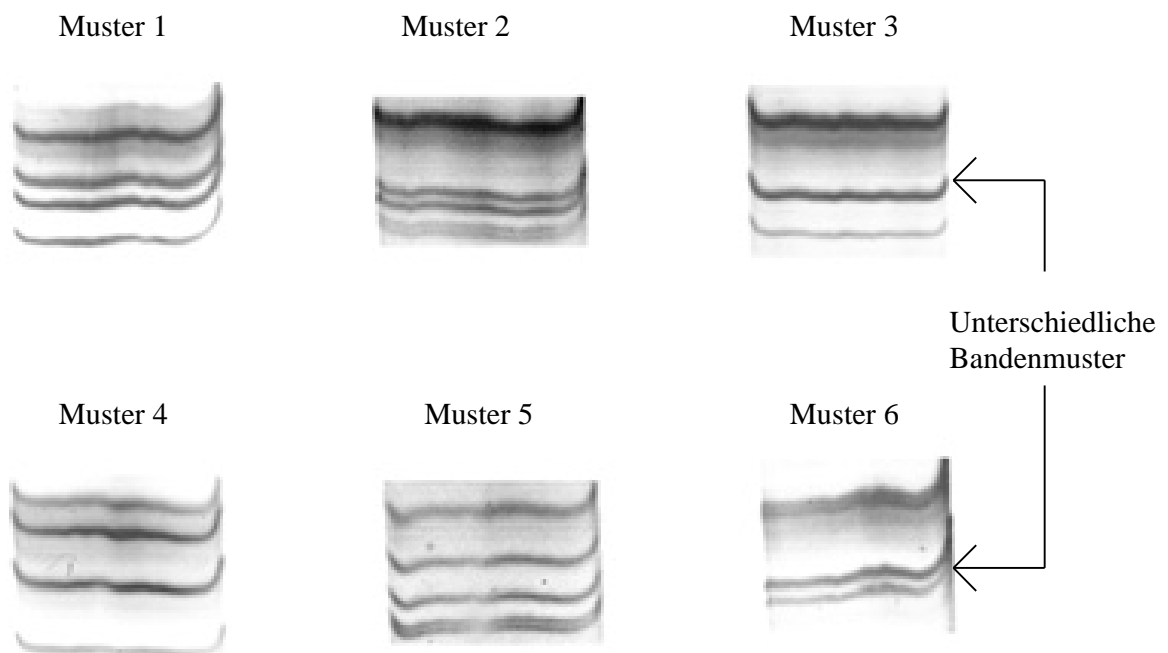


Abbildung 40: SSCP Exon 34: Polymorphismus

Man erkennt die unterschiedlichen Muster. Zur genaueren Verdeutlichung sind die Bandenmuster in schwarz/weiß und stark vergrößert dargestellt.

Die Sequenzierung der Proben ergab drei unterschiedliche Mutationen. Eine kurz vor, eine im und eine kurz nach dem Exon. Es stellte sich heraus, daß die Bandenmuster verschiedenen Kombinationen dieser drei Polymorphismen entsprachen. Die Positionen dieser Mutationen sind in folgendem Bild veranschaulicht:

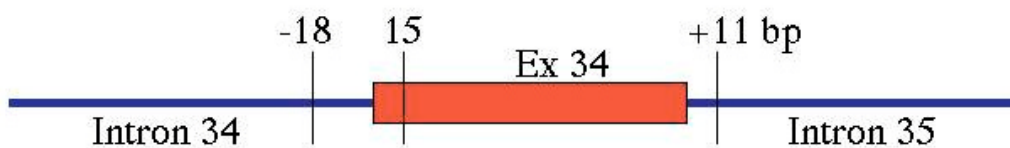


Abbildung 41: Position der SNPs in bzw. bei Exon 34

Die Zahlenangaben bezeichnen die Position der von den Mutationen betroffenen Basenpaare relativ zum Exon bzw. die Basenposition im Exon 34.

Für die sechs Muster ergaben sich bezüglich des entsprechenden Basenaustausches die in der folgenden Tabelle angegebenen Punktmutationen.

	Mutation im Intron 34	<i>Silent Mutation</i> im Exon 34	Mutation im Intron 35
Referenzsequenz	T	C	G
Muster 1	T	C	G/T
Muster 2	G	C/T	T
Muster 3	T	C	T
Muster 4	T	C	G
Muster 5	G	C/T	G/T
Muster 6	G	T	T

Tabelle 16: Den Bandenmustern entsprechende Punktmutationen

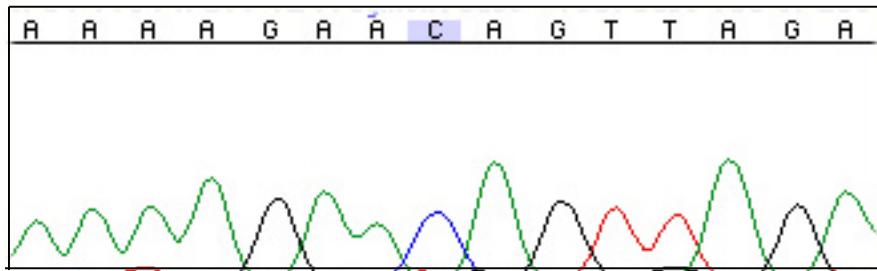


Abbildung 42: Intron 34: erste Intronmutation (Polymorphismus)

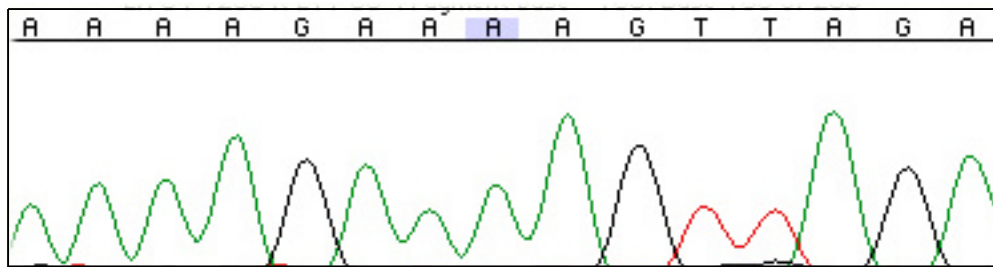


Abbildung 43: Intron 34: Wildtyp

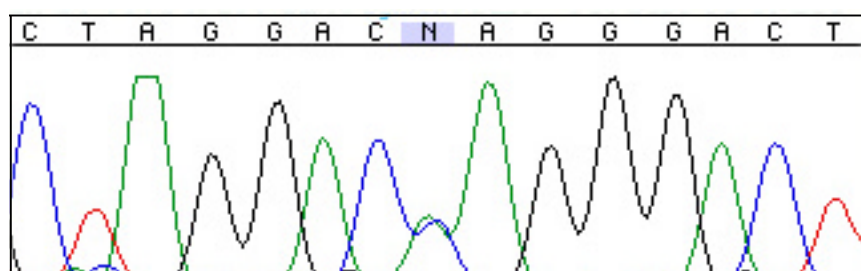


Abbildung 44: Intron 35: zweite Intronmutation (Polymorphismus)

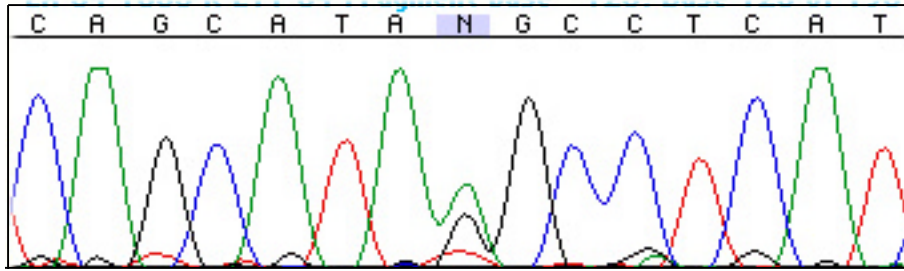


Abbildung 45: Exon 34: silent mutation (Polymorphismus)

Die Analyse der statistischen Verteilung der Bandenmuster ergab folgende Aufteilung.

Musterverteilung

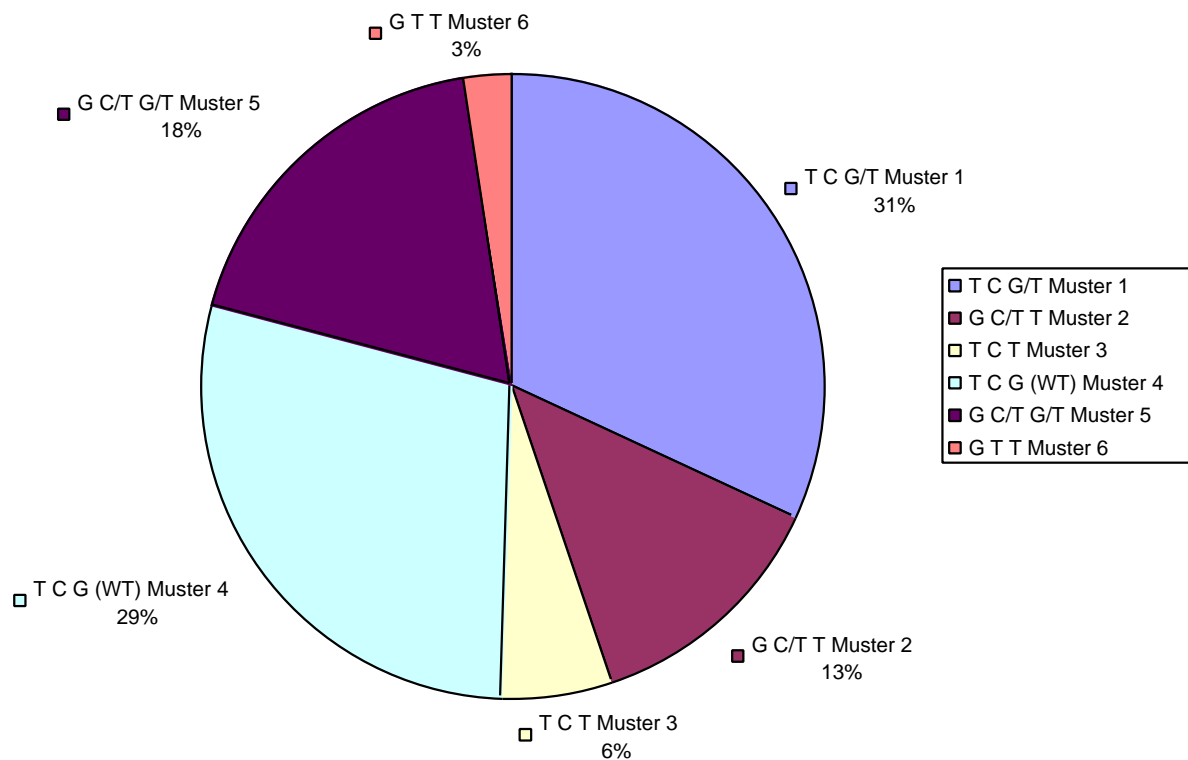


Abbildung 46: Musterverteilung des Polymorphismus in Exon 34

Man erkennt, daß es bestimmte Muster bzw. Kombinationen von SNPs gibt, die häufiger vorkommen, als andere. Es ist fraglich, ob diese SNP-Kombinationen ein phänotypisches Korrelat aufweisen, welches sich günstig oder ungünstig auf den Organismus auswirkt.

Exon 35

Die SSCP von Exon 35 wurde mittels eines PAA-Gels sowie eines FA-Gels durchgeführt. Es fielen keine abweichenden Bandenmuster auf. Die Wildtypsequenz konnte in der Sequenzierung bestätigt werden.



Abbildung 47: SSCP Exon 35

10% FA-Gel, 20°C, 40 Min.

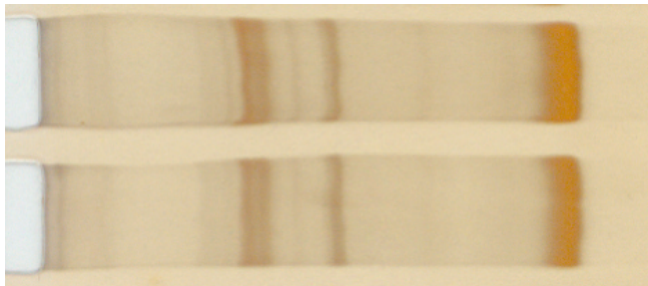


Abbildung 48: SSCP Exon 35

12% PAA-Gel, 4°C, 40 Min.

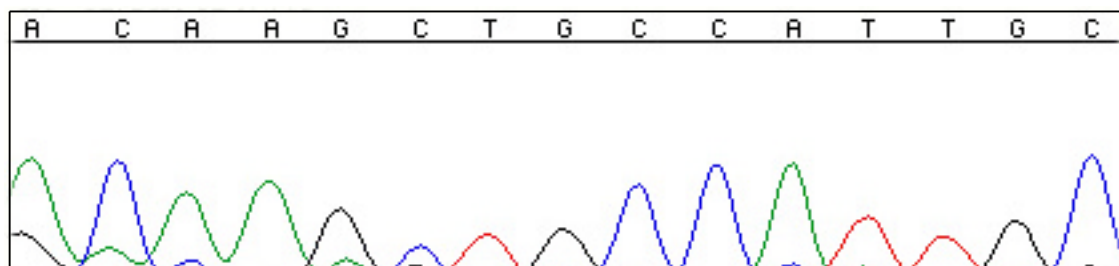


Abbildung 49: Sequenzierung Exon 35

Exon 36

Zur SSCP des Exons 36 wurden zwei PAA-Gele unterschiedlicher Konzentration verwendet. Es erwiesen sich in allen Proben keine Banden als auffällig. Die Wildtypsequenz konnte in der Sequenzierung bestätigt werden.



Abbildung 50: SSCP Exon 36

10% PAA-Gel, 10°C, 60 Min.

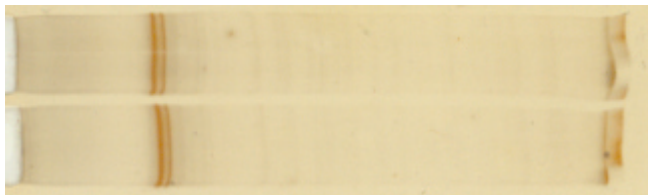


Abbildung 51: SSCP Exon 36

12% PAA Gel, 20°C, 70 Min.

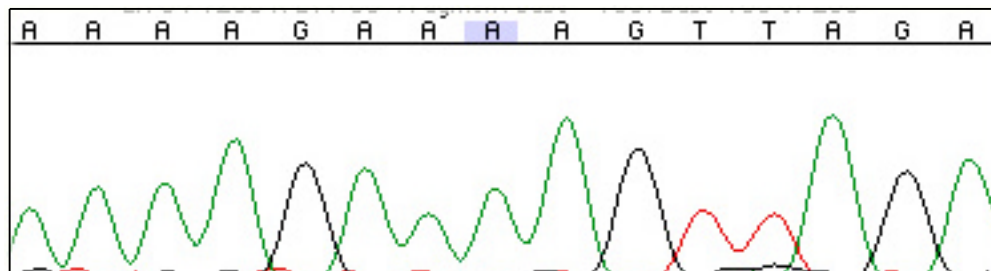


Abbildung 52: Sequenzierung Exon 36

Die Sequenzierung war unauffällig. Die Wildtypsequenz konnte bestätigt werden.

Zusammenfassung der Ergebnisse der genetischen Analysen:

Exon	SSCP	Sequenzierung	Aminosäure	Bemerkungen
27	Unauffällig	Wildtyp		
28	Polymorphismus	Intronmutationen		
29	Unauffällig	Wildtyp		
30	Auffällig	Wildtyp		Keine Bestätigung
31/32	Auffällig	<i>Missense Mutation</i> (Ex 32)	Val1394Ile	
33	Auffällig	Wildtyp		Keine Bestätigung
34	Polymorphismus	Intronmutation 1, Intronmutation 2, <i>Silent Mutation</i>		
35	Unauffällig	Wildtyp		
36	unauffällig	Wildtyp		

Es wurden also insgesamt 10 Exons mittels SSCP auf Mutationen im Myomesingen untersucht. In den Exons 28 und 34 wurden SNPs gefunden. Drei weitere Exons wiesen in der SSCP einzelne auffällige Banden bei bestimmten DNA-Proben auf. In den Exons 30 und 33 konnte in der Sequenzierung kein Basenaustausch nachgewiesen werden. In Exon 32 wurde eine *Missense Mutation* gefunden, die an der Aminosäureposition 1394 ein Valin durch ein Isoleucin ersetzt. Die übrigen Exons waren in der SSCP in allen Proben unauffällig.

Nachdem die *Missense Mutation* in Exon 32 identifiziert worden war, konnte die Familie des betroffenen Patienten untersucht werden. Dabei ergab sich, daß von elf untersuchten Familienmitgliedern sechs die Mutation tragen. Von diesen Mutationsträgern wiederum sind drei an HCM erkrankt.

Familie A:

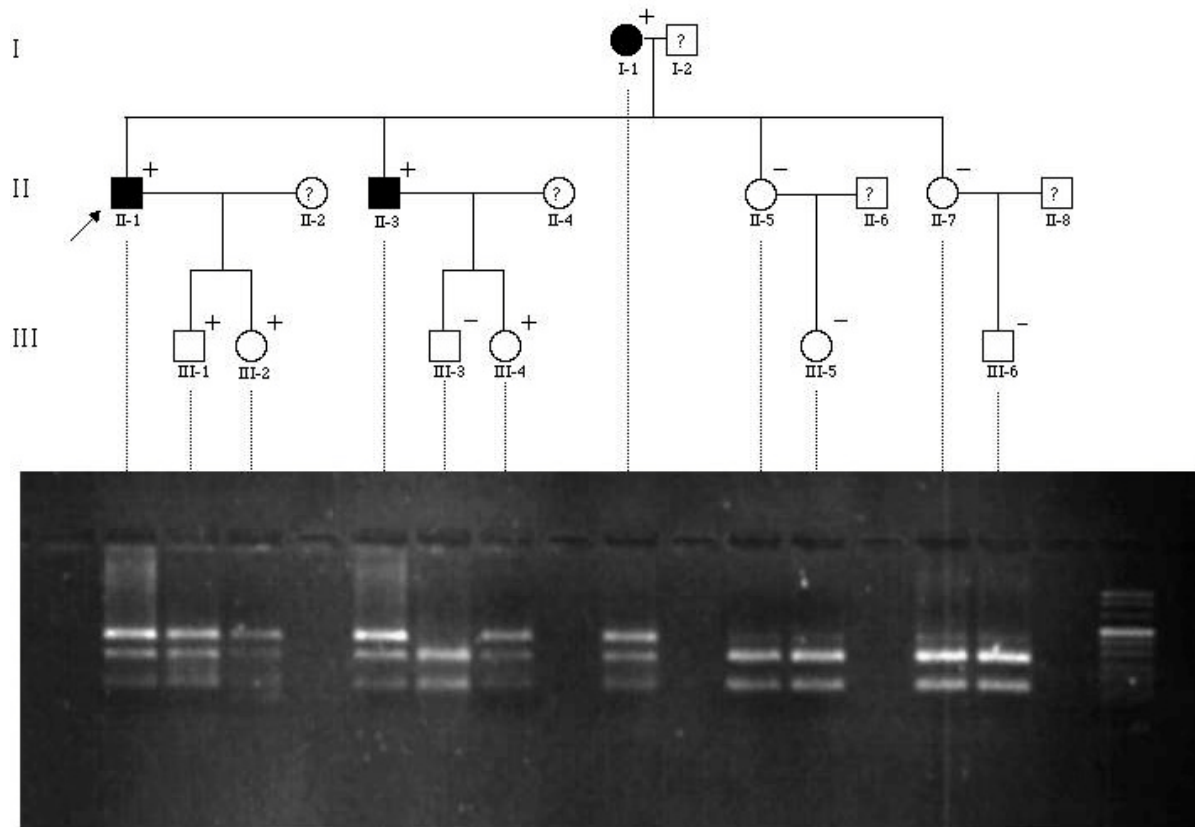


Abbildung 53: Stammbaum der Familie; Mutationsträger

In dieser Abbildung ist der Stammbaum der von der Mutation betroffenen Familie dargestellt. Den einzelnen Familienmitgliedern gegenübergestellt sieht man das Ergebnis eines umfassenden Restriktionsverdau. Wiederum weisen 3 Banden auf eine Mutation hin, 2 Banden auf den Wildtyp. Von der HCM Betroffene sind schwarz unterlegt. Die Person II-1 (Pfeil) ist der Proband, der in der SSCP aufgefallen war. Man erkennt, daß die Mutation über mehrere Generationen weitergegeben wurde.

Klinische Daten der Familie A:

Wie man der Tabelle entnehmen kann, tragen sechs Familienmitglieder die Mutation, von denen drei von der HCM betroffen sind. Der Patient II-1 ist der Indexpatient, der in der SSCP aufgefallen war.

Dieser Patient weist die Merkmale einer HCM auf. Das interventrikuläre Septum weist eine Dicke von 17 mm auf, die Ventrikelhinterwand eine Dicke von 15 mm. Die diastolische Funktion ist gestört.

Der Patient weist Merkmale einer Herzinsuffizienz der Stufe II nach NYHA auf. Diagnostiziert wurde die HCM bei diesem Patienten im Alter von 48. Er ist zum Zeitpunkt der Untersuchung 55 Jahre alt.

Tabelle 17: Klinische Daten der betroffenen Familie

Proband	I-1	II-1	II-3	II-5	II-7	III-1	III-2	III-3	III-4	III-5	III-6
Mut.	V1394Ile	V1394Ile	V1394Ile	/	/	V1394Ile	V1394Ile	/	V1394Ile	/	/
klin. Status	betroffen	betroffen	betroffen	n. betr.	n. betr.	n. betr.	n. betr.	n. betr.	n. betr.	n. betr.	n. betr.
Sonst. Erkrankungen	Hypertonie	/	Hypertonie	/	/	/	/	/	/	/	/
Alter	75	55	51	45	52	26	23	n.d.	23	18	27
Alter Diag.	n.d.	48	n.d.	/	/	/	/	/	/	/	/
NYHA	II	II	/	II	/	/	/	/	/	/	/
IVS	15	17	18	12	8	10	10	9	8	11	11
PW	15	15	13	9	9	9	8	7	8	13	12
IVS/PW	1,0	1,13	1,38	1,3	0,89	1,11	1,25	1,29	1,0	0,85	0,92
LVEF	60%	n.d.	n.d.	n.d.	55%	70%	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	66%
LVESD	23	34	31	34	34	n.d.	28	38	34	28	34
LVEDD	44	51	50	49	46	n.d.	43	56	48	43	46
LA	43	53	36	34	27	35	35	23	34	33	31
Grad.	n.d.	/	/	/	n.d.	n.d.	/	/	/	/	n.d.
Diast. Funktion	n.d.	abnormal	abnormal	Normal	n.d.	n.d.	Normal	normal	Normal	Normal	n.d.
Rhythmus	Sinus	Sinus	Sinus	Sinus	Sinus	Sinus	Sinus	Sinus	Sinus	Sinus	Sinus
Path. Q	/	s.u.	/	/	V1, V2	/	/	/	/	/	/
Neg. T	/	/	/	/	/	/	/	/	III, V2	/	/
Herz-Block	/	PQ=225; LAHB	/	/	/	/	/	/	/	/	/

Anhand der klinischen Daten der betroffenen Familie kann man erkennen, daß die V1394Ile Mutation mit der hypertrophen Kardiomyopathie assoziiert ist.

Der Bruder des Patienten, II-3, der ebenfalls die Mutation trägt, weist ein ähnliches Ausmaß einer Hypertrophie auf. Sein Septum interventriculare ist 18 mm breit, die Ventrikelhinterwand ist 13 mm dick. Er klagt nicht über Symptome einer Herzinsuffizienz, und sein EKG ist unauffällig. Es wurde bei ihm ein Hypertonus diagnostiziert.

Die Mutter beider Patienten, 75 Jahre alt, I-1, die ebenfalls die Mutation trägt, weist auch Anzeichen einer Hypertrophie auf: Die Dicke des Septums beträgt 15 mm, die Dicke der Hinterwand ebenso 15 mm. Auch bei ihr wurde ein Hypertonus diagnostiziert. Ihr EKG ist unauffällig. Sie hat Symptome einer Herzinsuffizienz der Klasse II nach NYHA.

Die Kinder des Patienten II-1, III-1 und III-2 tragen beide die Mutation, sie sind bisher nicht von der HCM betroffen. III-1 ist 26 Jahre alt, seine Septumdicke beträgt 10 mm, sein EKG ist unauffällig. Patientin III-2 ist 23 Jahre alt. Ihre Septumdicke beträgt ebenfalls 10 mm, und ihr EKG ist unauffällig.

Die Tochter des Patienten II-3, Patientin III-4, ist auch noch nicht von der HCM betroffen. Sie ist 23 Jahre alt. Ihr EKG ist unauffällig. Ihre Septumdicke beträgt 8 mm. Die anderen Familienmitglieder, die die Mutation nicht tragen, weisen keine Merkmale einer HCM auf.

Bedeutung der Mutation auf molekularer Ebene:

Obwohl die V1394Ile-Mutation nur einen Aminosäure-Austausch zwischen zwei nahe verwandten Aminosäuren (Valin und Isoleucin) bewirkt, scheint sie doch schwerwiegendere Auswirkungen zu verursachen, als zu vermuten wäre. Dieser Verdacht wird erhärtet durch einen Vergleich der Aminosäuresequenzen des Myomesins verschiedener Spezies.

	1394
Homo Sapiens:	YYVEDLK V NWSHNGS
Mus musculus:	YYLDDLK V NWSHNGT
Gallus gallus:	YYVEDLR V GWVHNDT
Xenopus laevis:	YFVEDLK V SWDHNDA

Die Gegenüberstellung der DNA-Sequenzen des Myomesins verschiedener Spezies zeigt, daß das von der Mutation betroffene Valin im Verlauf der Evolution hoch konserviert worden ist. Dargestellt ist ein Ausschnitt aus der Aminosäuresequenz der Domäne 12. Das Valin hat die Aminosäureposition 1394

Man erkennt, daß das betreffende Valin im Verlauf der Evolution hoch konserviert worden ist, was darauf schließen läßt, daß es eine wichtige Funktion erfüllt. Das Valin befindet sich an dieser Stelle des Proteins im hydrophoben Kernbereich eines β -Faltblatts der Domäne 12. Dort weist sein spezifischer Aminosäurenrest ins Innere dieses Faltblatts. Wenn durch die Mutation das Valin durch ein Isoleucin ersetzt wird, könnte dadurch die Tertiärstruktur verändert werden.

Die genauen molekularen Mechanismen, die einer Funktionsbeeinträchtigung des Proteins zugrundeliegen, müssen noch geklärt werden.