

Aus dem Labor für Pädiatrische Molekularbiologie der  
Klinik für Allgemeine Pädiatrie  
des Otto-Heubner-Centrums für Kinder- und Jugendmedizin  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Die Sequenzierung der kodierenden Sequenz des *FBN1*-Gens bei  
126 Patienten mit Marfan-Syndrom und verwandten  
Fibrillinopathien und die sich aus den gefundenen Mutationen  
ableitenden Genotyp-Phänotyp-Korrelationen**

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Stefanie Katzke

aus Rotenburg/Wümme

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. Gerhard Gaedicke  
2. Prof. Dr. med. Stefan Mundlos  
3. Prof. Dr. med. Hashim Abdul-Khaliq

Datum der Promotion: 19.11.2010

Ich widme diese Arbeit dem Andenken meines Vaters, in Dankbarkeit und Liebe.

*„Es ist vor allem wichtig, dass Du lernst, gute Fragen zu stellen.“*

---

**INHALTSVERZEICHNIS**

<b>1. Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1. Das Marfan-Syndrom .....	1
1.1.1. Skelettsystem .....	3
1.1.2. Okuläres System .....	3
1.1.3. Kardiovaskuläres System .....	4
1.1.4. Respiratorisches System und Integument .....	6
1.1.5. Lebenserwartung bei MFS.....	6
1.2. Differentialdiagnosen des Marfan Syndroms.....	7
1.3. Fibrillin-1.....	9
1.3.1. Struktur und Funktion .....	9
1.3.2. Fibrillin -1, -2 und -3.....	12
1.3.3. Die Rolle des Kalziums im cbEGF-Modul .....	12
1.4. <i>FBN1</i> Mutationen beim MFS .....	13
1.5. Theorien über die Pathogenese des Marfan-Syndroms.....	14
1.5.1. Der dominant negative Effekt .....	14
1.5.2. Der Einfluss der Haploinsuffizienz auf die Pathogenese .....	15
1.5.3. Fibrillin-1 Mutationen und die Gewebshomöostase .....	15
1.5.4. Die Rolle der Proteolyse in der Pathogenese des MFS.....	16
1.5.5. Induktion der Makrophagenchemotaxis durch Fibrillin-1 Fragmente .....	17
1.5.6. Eine gestörte Regulation der TGF- $\beta$ Aktivierung scheint zur Pathogenese des MFS beizutragen .....	17
<b>2. Fragestellung der Arbeit</b> .....	<b>19</b>
<b>3. Material und Methoden</b> .....	<b>20</b>
3.1. Material .....	20
3.1.1. Chemikalien.....	20
3.1.2. Puffer .....	21
3.1.3. Sonstige Lösungen .....	21
3.1.4. Enzyme.....	21
3.1.5. Oligonukleotid Primer, Mononukleotide, Radionuklide.....	21
3.1.6. DNA, DNA-Marker und Andere.....	22
3.1.7. Geräte und Zubehör .....	22
3.2. Methoden .....	23
3.2.1. Zellkultur .....	23
3.2.2. Isolierung genomischer DNS aus Fibroblasten.....	23
3.2.3. DNA-Extraktion aus EDTA-Blut .....	24

3.2.4.	Konzentrationsbestimmung der DNS.....	25
3.2.5.	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR).....	26
3.2.6.	Gel-Elektrophorese.....	27
3.2.7.	Temperatur-Gradienten-Gel-Elektrophorese (TGGE).....	27
3.2.8.	Silberfärbung .....	28
3.2.9.	Sequenzierung.....	28
3.2.10.	Restriktionsenzyme .....	31
3.2.11.	Allelspezifische PCR zum Nachweis von Mutationen.....	31
<b>4.</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>32</b>
4.1.	Klinische Daten .....	32
4.1.1.	Das Patientenkollektiv .....	32
4.1.2.	Klinische Details der Patienten .....	33
4.2.	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR).....	38
4.2.1.	Optimierung der PCR-Ansätze .....	38
4.2.2.	Primer-Auswahl .....	39
4.3.	Temperatur-Gradienten-Gel-Elektrophorese (TGGE) .....	41
4.3.1.	Perpendikuläre TGGE zur Optimierung des Temperaturgradienten.....	41
4.3.2.	„Travelschedule-TGGE“ zur Optimierung der Laufzeiten.....	41
4.3.3.	Duplex-TGGE .....	43
4.4.	In der Screeninggruppe gefundene Mutationen .....	47
4.4.1.	Missense Mutationen.....	49
4.4.2.	Restriktionsenzyme .....	56
4.4.3.	Polymorphismen.....	56
<b>5.</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>57</b>
5.1.	Mutationsscreening des Fibrillin-1 Gen mittels Temperatur-Gradienten-Gel-Elektrophorese (TGGE) .....	57
5.2.	Mutationen bei MFS und verwandten Erkrankungen.....	59
5.2.1.	Missense-Mutationen.....	60
5.2.2.	Entstehung eines vorzeitigen Stopcodons.....	74
5.2.3.	Spleißfehler .....	76
5.3.	Genotyp-Phänotyp Korrelationen .....	76
5.3.1.	Neonatales Marfan-Syndrom (nMFS).....	77
5.3.2.	Atypisch schweres MFS .....	78
5.3.3.	Mild ausgeprägtes MFS.....	78
5.3.4.	Fibrillinopathien.....	79
5.3.5.	Bedeutung für den Patienten .....	79

5.4. Mutations-Detektions-Rate.....	80
<b>6. Zusammenfassung.....</b>	<b>83</b>
<b>7. Literaturverzeichnis.....</b>	<b>85</b>
<b>8. Anhang .....</b>	<b>95</b>

## TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1.1.: Diagnosekriterien für das Marfan-Syndrom, Genter Nosologie .....	2
Tabelle 1.2: Differentialdiagnosen des Marfan-Syndrom.....	9
Tabelle 4.1.: Verteilung der Phänotypen bei den 126 Patienten der Studie .....	32
Tabelle 4.2.: Übersicht der klinischen Manifestationen aller Patienten der Studie ....	38
Tabelle 4.3.: Primer, PCR und TGGE-Bedingungen .....	46
Tabelle 4.4.: Übersicht der Mutationen, die in dieser Studie gefunden wurden.....	48
Tabelle 4.5.: Verwandte Restriktionsenzyme und die Konsequenz für die Schnittstelle durch die vorliegende Mutation .....	56
Tabelle 4.6.: in der Studie gefundene Polymorphismen .....	56
Tabelle 5.1.: Missense-Mutationen die ein Zystein in cbEGF-Modulen betreffen.....	60
Tabelle 5.2.: Verteilung der bekannten Mutationen, die einen Zysteinrest betreffen ..	60
Tabelle 5.3.: Mutationen im Bereich der kalziumbindenden Konsensus-Sequenz ....	64
Tabelle 5.4.: Übersicht der Mutationen an Position 2 der Kalziumbindenden-Konsensussequenz.....	64
Tabelle 5.5.: Mutationen dieser Studie in der kalziumbindenden Konsensussequenz .....	65
Tabelle 5.6.: Mutationen an Position 4 der kalziumbindenden Konsensussequenz ..	66
Tabelle 5.7.: Mutationen die andere Reste im cbEGF betreffen.....	66
Tabelle 5.8.: Mutationen die zu einer neuen N-Glykosylierungsstelle führen .....	68
Tabelle 5.9.: N-Terminal gelegene Mutationen.....	70
Tabelle 5.10.: : LTBP-Mutationen.....	72
Tabelle 5.11.: Übersicht über G3037A-Mutationen in Exon 24 .....	73
Tabelle 5.12.: Nonsense Mutationen.....	75
Tabelle 5.13.: Mutationsdetektionsrate in Studien mit <i>FBN1</i> Analyse bei Patienten mit MFS .....	81

---

**ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS**

APS	Ammoniumperoxidsulfat
AS	Aminosäure
bp	Basenpaare (engl. <i>base pairs</i> )
BW	Bindungs- und Waschpuffer
C	Zystein (engl. <i>cysteine</i> )
cb	kalziumbindend (engl. <i>calcium bindung</i> )
CCA	kongenitale kontraktuelle Arachnodaktylie (engl. <i>Congenital contractural arachnodactyly</i> )
CMC	chemische Modifizierung und Spaltung (engl. <i>chemical modification and cleavage</i> )
CSGE	Konformations-Sensitive Gelelektrophorese (engl. <i>conformation-sensitive gel electrophoresis</i> )
cv	kardiovaskulär (engl. <i>cardiovascular</i> )
ddH <sub>2</sub> O	Aqua bidestillata (engl. <i>double distilled</i> )
ddNTPs	Dideoxynukleosidtriphosphate
DGGE	denaturierende Gradienten-Gelelektrophorese
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxynukleosidtriphosphate
DTT	Dithiotreitol
E	Extinktion
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	epidermaler Wachstumsfaktor (engl. <i>epidermal growth factor</i> )
EL	Ektopia lentis
EMD	engl. enzymatic mismatch detection
FISH	fluoreszente <i>in situ</i> -Hybridisierung
GPK	Genotyp-Phänotyp-Korrelation
HA	Heterodupleyanalyse
HCL	Salzsäure
Hg	Quecksilber
IVS	intronische variable Sequenz
kA	keine Angaben
kb	Kilobasenpaare
KD	Kilodalton
LP	Ladepuffer
LTPB	engl. latent transforming growth factor $\beta$ 1 binding protein
M	Molar
ME	MOPS-EDTA (Puffer)
MFS	Marfan-Syndrom
Min.	Minuten
MI	Mitralinsuffizienz
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
Mg	Magnesium
Mn	Mangan
MOPS	3-(N-morpholino)- Propansulfonsäure
MRT	Magnetresonanztomographie
NaCl	Natriumchlorid

NaOH	Natriumhydroxid
NE	New England BioLabs Inc.
Nt	Nukleotid
OD	optische Dichte
PBS	phosphatgepufferte Natriumchloridlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion (engl. Polymerase chain reaction)
PTC	engl. Premature Termination Codon, Entstehung eines vorzeitigen Stopcodons
RT	Raumtemperatur
<sup>35</sup> S	radioaktiv markierter Schwefel
SD	Standardabweichung
SDS	Natrimdodecylsulfat (engl. sodium dodecyl sulphate)
SGS	Shprintzen-Goldberg-Syndrom
SkO	skelettale und okuläre Manifestationen
SSCA	Einzelstrang-Konformationsanalyse (engl. single-strand conformational analysis)
SSCP	Einzelstrang-Konformationspolymorphismus (engl. single strand conformation polymorphism)
SSW	Schwangerschaftswoche
TBE	Tris-Borat/EDTA (Puffer)
TEMED	N,N; N',N' - Tetramethyldiamin
TGFβ	Transformierender Wachstumsfaktor Beta (engl. transforming growth factor beta 1)
TGGE	Temperaturgradienten-Gelelektrophorese
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-Aminomethan
U	Einheiten (engl. <i>units</i> )
UV	ultraviolett

**ABBILDUNGSVERZEICHNIS**

Abbildung 1.1.: Struktur des Fibrillin-1.....	10
Abbildung 1.2: kalziumbindende EGF-Domäne.....	13
Abbildung 4.1.: Perpendikuläre TGGE-Analyse .....	41
Abbildung 4.2.: "Travelschedule-TGGE" Zur Optimierung der Laufzeiten.....	42
Abbildung 4.3.: TGGE Exon 24 .....	43
Abbildung 4.4.: Duplex-TGGE .....	43
Abbildung 4.5.: Patient D55 (c.184C>T, Exon 2) .....	49
Abbildung 4.6.: a: Patient D10 Exon 3; b: TGGE D10 und den gesunden Eltern .....	49
Abbildung 4.7.: a: B51 c.2341T>C (Exon 19), b: D16 c.5993G>A (Exon 48).....	50
Abbildung 4.8: Exon 54 .....	51
Abbildung 4.9.: a: B45 c.6806T>C (Exon 55), b: D36 c.4217A>G (Exon 34).....	52
Abbildung 4.10.: a: D1 c.3898A>G p.K1300E (Exon 31) (P= Patient, C= Kontrolle).52	
Abbildung 4.11.: D7 c.2722T>C (Exon 22).....	53
Abbildung 4.12.: B9 c.2055C>G (Exon 16) .....	53
Abbildung 4.13.: a: D60 (Exon 24); b: B47 (Exon 24).....	54
Abbildung 4.14.: a:D30 (Exon 50) b: B52 (Exon 47).....	55
Abbildung 5.1.: Lokalisation der Mutationen in konservierten Zysteinresten .....	62
Abbildung 5.2.: : Mutationen im LTBP-Motiv .....	74

# 1. Einleitung

## 1.1. Das Marfan-Syndrom

Das Marfan-Syndrom (MFS), benannt nach dem Pariser Kinderarzt Antoine-Bernard Marfan (1858-1942), ist eine autosomal dominant vererbte, pleiotrope Erkrankung des Bindegewebes, die dazu führt, dass eine einzelne Mutation diverse Manifestationen in unterschiedlichen Organsystemen bewirkt. Sie zeigt zudem eine hohe klinische intra- und interfamiliäre Variabilität der Symptome bei einer variablen Penetranz. In den meisten klinischen Beschreibungen werden drei Organsysteme besonders hervorgehoben: das Skelettsystem, die Augen und das kardiovaskuläre System. Aber auch Haut, Faszien, Skelettmuskulatur, Fettgewebe und die Lungen können involviert sein (Pyeritz 2000). Die Haupttodesursache beim MFS und die dadurch verkürzte Lebenserwartung stellen die kardiovaskulären Manifestationen dar (Silverman 1995). Die Prävalenz der Erkrankung liegt bei 2-3 pro 10.000 (Pyeritz 2000). In 25% - 30% der Fälle handelt es sich um Spontanmutationen (Gray 1994), die sich offenbar mit zunehmendem paternalen Alter häufen (Murdoch 1972b). Das MFS ist in allen großen ethnischen Gruppen zu finden und zeigt keine geographischen, geschlechtsbezogenen oder rassentypischen Unterschiede in der Prävalenz (Pyeritz 2000).

Die Diagnose des MFS erfolgt auf der Grundlage klinischer Kriterien nach der Genter Nosologie (DePaepe 1996). Es werden in den verschiedenen Organsystemen Haupt- und Nebenkriterien definiert, zudem können molekulare Analysen in die Diagnose einbezogen werden. Trotz der Entdeckung des zugrunde liegenden Defekts im Fibrillin-1-Gen (*FBN1*-Gen), liegt der Schwerpunkt der Diagnosestellung bei den klinischen Zeichen und der Familienanamnese (DePaepe 1996). Nach der Genter Nosologie kann die Diagnose MFS gestellt werden, wenn:

- 1) in zwei Organsystemen Hauptkriterien vorhanden sind und ein drittes Organsystem beteiligt ist, oder
- 2) wenn eine *FBN1*-Mutation nachgewiesen wird, die bei einem anderen Patienten mit einem eindeutigen MFS assoziiert ist. Dann muss ein Hauptkriterium vorhanden und ein weiteres Organsystem beteiligt sein, oder
- 3) wenn ein Verwandter des Betroffenen ein MFS nach Punkt 1. aufweist, muss ein Hauptkriterium vorhanden und ein weiteres Organsystem beteiligt sein.

<b>Skelettsystem</b>
<b>Hauptkriterium:</b> 1) Pectus carinatum, 2) Pectus excavatum (operationspflichtig) 3) Verhältnis Armspanne/Körperlänge >1,05 oder Verhältnis Oberlänge/Untерlänge >0,85, 4) Positives Murdoch- und Steinbergzeichen 5) eingeschränkte Ellenbogenstreckung (<170°), 6) Skoliose >20° oder Spondylolisthese 7) Pes planus (mediale Dislokation des Malleolus) 8) Protrusio acetabuli
<b>Nebenkriterium:</b> 1) milde Trichterbrust, 2) Überstreckbarkeit der Gelenke, 3) hoher gotischer Gaumen, 4) typische Fazies (Dolichocephalie, Malarhypoplasie, Enophthalmus, Retrognathie, antimongoloide Lidachse)
Beitteilung des skelettalen Systems: mindestens 2 Punkte des Hauptkriteriums oder 1 Punkt des Hauptkriteriums und 2 Punkte des Nebenkriteriums
<b>Okuläres System</b>
<b>Hauptkriterium:</b> bilaterale Ektopia lentis
<b>Nebenkriterium:</b> 1) abnorm flache Kornea, 2) Verlängerung der Bulbusachse, 3) Hypoplastische Iris/Ciliarmuskeln
Beteiligung des okulären Systems: mindestens 2 Punkte des Hauptkriteriums
<b>Kardiovaskuläres System</b>
<b>Hauptkriterium:</b> 1) Dilatation der Aorta ascendens inklusive der Sinus valsalvae mit/ohne Aortenklappeninsuffizienz, 2) Dissektion der Aorta ascendens
<b>Nebenkriterium:</b> 1) Mitralklappenprolaps, 2) Dilatation der A. pulmonalis ohne Pulmonalklappen- oder periphere Pulmonalstenose (vor dem 40. Lebensjahr), 3) Verkalkung des Mitralannulus (vor dem 40. Lebensjahr), 4) Dilatation oder Dissektion der Aorta descendens oder abdominalis (vor dem 50. Lebensjahr)
Beteiligung des kardiovaskulären Systems: mindestens 1 Punkt des Nebenkriteriums
<b>Pulmonales System</b>
<b>Hauptkriterium:</b> keines
<b>Nebenkriterium:</b> 1) spontaner Pneumothorax, 2) apikale Emphysemläschen
Beteiligung des pulmonalen Systems: mindestens 1 Punkt des Nebenkriteriums
<b>Haut und Dura</b>
<b>Hauptkriterium:</b> Lumbosakrale durale Ektasie
<b>Nebenkriterium:</b> 1) Striae atrophicae, 2) rezidivierende Hernien
Beitteilung des Integument: mindestens 1 Punkt des Nebenkriteriums
<b>Familienanamnese</b>
<b>Hauptkriterium:</b> 1) Verwandter 1. Grades erfüllt unabhängig von der Indexperson die diagnostischen MFS-Kriterien, 2) Nachweis einer <i>FBN1</i> -Mutation, die bekanntermaßen das MFS verursachen kann, 3) Nachweis eines in der Familie des Patienten an das MFS gekoppelten Haplotyps
<b>Nebenkriterium:</b> keines
Beteiligung der Familienanamnese: mindestens 1 Punkt des Hauptkriteriums

Tabelle 1.1.: Diagnosekriterien für das Marfan-Syndrom, Genter Nosologie

### 1.1.1. Skelettsystem

Die Veränderungen im Skelettsystem sind größtenteils auf das überschießende Wachstum der langen Röhrenknochen zurückzuführen. Im Verhältnis zum Rumpf sind die Extremitäten überproportional lang und schmal (Dolichostenomelie). Auffällig ist ein Verhältnis von Oberlänge zu Unterlänge (Abstand Boden - Os pubis)  $> 0,85$  und der Armspanne zur Körperlänge ab 1,05. Eine Arachnodaktylie liegt vor, wenn Steinberg- und Murdoch-Zeichen positiv sind. Ist das Steinberg-Zeichen positiv, ragt der in die Faust eingeschlossene Daumen über den ulnaren Rand der Hand hinaus. Beim positiven Murdoch-Zeichen müssen sich Daumen und kleiner Finger beim Umgreifen des anderen Handgelenkes überlappen. Am Schädel sind die Veränderungen der knöchernen Proportionen oft an unterentwickelten Wangenknochen (Malarhypoplasie), einem unterentwickelten Unterkiefer (Retrognathie), der eine Fehlstellung der Zähne begünstigt und an einem engen Mittelgesicht mit erhöhtem Längendurchmesser des Schädels (Dolichocephalie) erkennbar. Ein Enophthalmus und eine antimongoloide Lidachse sind ebenfalls oft vorhanden. Der harte Gaumen ist sehr schmal und hoch. Dies wird als „gotisch“ bezeichnet. Thoraxdeformitäten können sich zum einen als Pectus carinatum (Kielbrust) mit einer Vorwölbung des Sternums, zum anderen als ein Pectus excavatum (Trichterbrust) mit einer Einziehung des Sternums manifestieren. Während ein Pectus carinatum eher ein kosmetisches Problem darstellt, kann es bei einem stark ausgeprägten Pectus excavatum zu Beeinträchtigungen der Lungenfunktion und einer Rechtsherzdysfunktion kommen (Peyeritz 2000). Bei mindestens 25% aller Patienten kommt es zu Pes planus. Ungefähr 63% aller MFS-Patienten entwickeln bei gleicher Prävalenz in beiden Geschlechtern eine Skoliose mit einem Cobb-Winkel  $> 10^\circ$  (Sponseller 1995). Durch den insgesamt lockeren Bandapparat erhöht sich auch die Gefahr von Gelenksluxationen.

### 1.1.2. Okuläres System

Neben der im Vordergrund stehenden Myopie, können auch Veränderungen des Bulbus, der Linsen und der Retina den Visus einschränken. Bei ca. 60% der Patienten kommt es durch die hypoplastischen Ziliarmuskeln und Veränderungen an den Zonulafasern zu einer Subluxation oder Luxation der Linse. Die Ektopia lentis ist gewöhnlich bilateral und entwickelt sich oft in der frühen Kindheit. Auch bei dislozierter Linse bleiben die Zonulafasern in der Regel intakt und eine Akkomodation ist weiterhin

möglich (Maumenee 1981). Die schlecht fixierten Linsen der MFS-Patienten können auch in die vordere Augenkammer dislozieren und ein akutes Glaukom hervorrufen. Bei vielen Patienten ist die axiale Länge des Bulbus über die normalen 23,5mm hinaus vergrößert und erklärt die oft ausgeprägte Myopie. Zusätzlich kommt es dadurch zu einem abnormen Zug auf die Retina, wodurch Netzhautablösungen begünstigt werden (Pyeritz 1993). Ab der fünften Lebensdekade kann es zudem gehäuft zu Katarakten kommen (Pyeritz 2000). 20% haben einen Strabismus.

### **1.1.3. Kardiovaskuläres System**

Die häufigsten kardiovaskulären Veränderungen beim MFS sind die Dilatation des Bulbus aortae und der Mitralklappenprolaps. Die Aortendilatation prädisponiert zur Dissektion und Ruptur. 90% aller frühzeitigen Todesfälle sind auf kardiovaskuläre Komplikationen zurückzuführen (Murdoch 1972a). Daher ist die Suche nach Manifestationen im kardiovaskulären System ein wichtiges Ziel bei der Betreuung von MFS-Patienten. Moderne bildgebende Verfahren, wie Magnetresonanztomographie (MRT) und Echokardiographie (transthorakal und transösophageal) stellen die Untersuchungsmethoden der Wahl dar. Die MRT ist die beste Technik zur Beurteilung aller Abschnitte der Aorta. Echokardiographisch können folgende Aortendimensionen gemessen werden: Aortenklappenring, Sinus Valsalvae (Aortenwurzel), sinutubuläre Übergangszone und proximale Aorta ascendens. Bei der Interpretation des echokardiographisch ermittelten Aortendurchmessers ist die physiologische Korrelation zwischen Aortendurchmesser und Körperoberfläche zu beachten. Daher sollten bei Kindern und Jugendlichen entsprechende Nomogramme verwendet werden. Bei Erwachsenen ist diese Abhängigkeit aufgrund von Adipositas und Altersprozessen der Media nicht mehr eindeutig (Pyeritz 1993). 90% aller akuten Dissektionen beginnen in der Aortenwurzel, oberhalb der Ostien der Koronararterien (Pyeritz 2000). Der wichtigste Parameter, um das Risiko einer Aortendissektion oder Ruptur einzuschätzen, ist der Aortendurchmesser. Oberhalb von 50mm geht man von einem sicher erhöhten Dissektionsrisiko aus (v. Kodolitsch 1998b/c). Bei 50-80% aller MFS-Patienten kann echokardiographisch, unabhängig von Alter und Geschlecht, ein Prolaps der Mitralklappe festgestellt werden. Die Ausprägung des Prolapses verschlechtert sich oft mit dem Alter (Pyeritz 2000). Das Endokarditisrisiko ist bei einem Mitralklappenprolaps im Vergleich zur Normalbevölkerung etwa fünffach erhöht. Bei Patienten mit MFS geht man auch bei makroskopisch und funktionell intakten Herzklappen von einem erhöhten

Endokarditisrisiko aus, da Defekte an Klappen histologisch nachweisbar waren (v. Kodolitsch 1998a). Eine Endokarditis macht ungefähr 3% der Todesursachen beim MFS aus (Murdoch 1972a). Alle MFS Patienten sollten daher eine Endokarditisprophylaxe erhalten.

In einer großen prospektiven Studie konnte Mitte der 90er Jahre gezeigt werden, dass der prophylaktische Einsatz von Propranolol bei Patienten mit MFS die Entwicklung der Aortenwurzeldilatation verzögert und die Häufigkeit von Aortendissektionen und Todesfälle vermindert (Shores 1994). Das Patientenkollektiv war mit durchschnittlich 15,4 Jahren relativ jung. Dies ist interessant, da Studien mit älteren Patientenkollektiven diesen positiven Effekt der Betablockade nicht nachweisen konnten (v. Kodolitsch 1998c). Auch der Aortendurchmesser zu Beginn der Betablockertherapie scheint eine besondere Bedeutung zu haben, denn eine Wirksamkeit der Betablockertherapie konnte nur bei anfangs mäßig ausgeprägter Dilatation der Aortenwurzel bestätigt werden. Während Kinder und Jugendliche mit nur mäßig ausgeprägter Aortendilatation von einer Betablockertherapie profitieren, sollte die Indikation bei Erwachsenen überdacht werden, da die Nebenwirkungen die subjektive Lebensqualität durch bradykarde Rhythmusstörungen und Hypotonie deutlich einschränken können. Neuere Daten legen zudem nahe, dass die progrediente Dilatation der Aortenwurzel v.a. durch verstärkte, Transforming Growth Faktor Beta (TGF $\beta$ ) -vermittelte, Signalkaskaden begünstigt wird. Der Einsatz von Losartan, einem Angiotensin-II-Rezeptorblocker, der neben seiner antihypertensiven Wirkung auch die TGF $\beta$ -Aktivität senkt, soll diesen Prozess positiv beeinflussen und könnte den Betablockern überlegen sein (Neptune 2003/ Habashi 2006). Die günstigen therapeutischen Effekte des Losartans, die in einem Mausmodell gesehen wurden, werden gegenwärtig in einem größeren Patientenkollektiv geprüft (Lacro 2007). Bereits in einer Pilotstudie konnte gezeigt werden, dass Losartan von MFS-Patienten gut vertragen wird und zusätzlich eine günstige Wirkung auf die Aortendilatation besitzt (Brooke 2008).

Der Zeitpunkt eines elektiven Eingriffs zum prophylaktischen Ersatz der Aortenwurzel richtet sich im Wesentlichen nach dem Aortendurchmesser. Daher sind regelmäßige echokardiographische Kontrollen wichtig. Bei Durchmessern unter 40mm ist eine Kontrolle alle 12 Monate vertretbar, bei Durchmessern über 40mm sollte alle 6 Monate kontrolliert werden (v. Kodolitsch 1998a). Operativ saniert werden sollte ab einem Durchmesser von 45mm, wenn zusätzliche Risikofaktoren (Aortendissektionen in der

Familie, Aorten- und/ oder Mitralinsuffizienz, Aneurysmata bis über den sinutubulären Übergang hinaus und Progression von mehr als 5% pro Jahr) vorliegen. Fehlen diese Risikofaktoren kann mit der Operation gewartet werden, bis die Aorta einen Durchmesser von 50mm erreicht hat. Während bei einem elektiven Eingriff die Mortalität bei 2-3% liegt, steigt sie bei der Versorgung einer akuten Aortendissektion auf 10% (Carrel 1997).

### **1.1.4. Respiratorisches System und Integument**

Ungefähr 5% aller MFS-Patienten entwickeln einen spontanen Pneumothorax (Hall 1984). Zusätzlich kann infolge der Thoraxdeformität eine pulmonale Restriktion auftreten. Durch die Schlaffheit des Weichteilgewebes um die großen Luftwege, entwickeln einige Patienten obstruktive Ventilationsstörungen der Atemwege während des Schlafes, bis zum Schlafapnoesyndrom (Cistulli 1993).

Ungefähr zwei Drittel aller Patienten zeigen Striae atrophicae der Haut (Pyeritz 1993). Diese Striae können schon in der Kindheit als feine Streifen zu sehen sein, manifestieren sich in der Regel aber erst in der Pubertät und stehen, bei ohnehin nur spärlich ausgebildetem subkutanem Fettgewebe, nicht im Zusammenhang mit größeren Gewichtsveränderungen (Pyeritz 2000). Auch Hernien, insbesondere Leistenhernien, sind häufig. Sie können angeboren oder erworben sein und zeigen nach operativen Revisionen oft Rezidive. Eine Duraektasie ist ebenfalls häufig zu finden und lässt sich mittels MRT einfach nachweisen. Da sie in der Normalbevölkerung nur sehr selten zu finden ist, gilt sie als hoch charakteristisches Symptom für das MFS. In der Regel ist die Duraektasie asymptomatisch, es kann aber zu radikulären Schmerzen durch Kompression der Nerven kommen (Pyeritz 2000).

### **1.1.5. Lebenserwartung bei MFS**

Die kardiovaskulären Manifestationen stellen die wesentliche Todesursache beim MFS dar. In einer großen retrospektiven Studie Anfang der 70er zeigte sich, dass die mittlere Lebenserwartung bei unbehandelten MFS Patienten mit 32 Jahren erheblich verkürzt war (Murdoch 1972a). In den folgenden 30 Jahren konnte, durch eine deutliche Qualitätssteigerung bildgebender Diagnoseverfahren und die erheblichen Verbesserungen im operativen, kardiovaskulären Management, die Lebenserwartung auf über 60 Jahre angehoben werden (Silverman 1995/ v. Kodolitsch 1998c). Durch eine interdisziplinäre Betreuung und prophylaktische Maßnahmen kann man der

Entstehung von Komplikationen vorbeugen. Dabei sind die Aufklärung über die Erkrankung, eine angepasste Lebensweise (keine isometrischen Belastungen, keine Kontaktsportarten) und die Lebensplanung (Lebenserwartung, Schwangerschaftsrisiko und die 50% Wahrscheinlichkeit der Vererbung an die Kinder aufgrund des autosomal-dominanten Erbgangs) von grundlegender Bedeutung (v. Kodolitsch 1998b).

### 1.2. Differentialdiagnosen des Marfan Syndroms

Die Diagnose des MFS ist oft nicht leicht zu stellen. Zum einen finden sich viele Merkmale der Erkrankung isoliert in der Allgemeinbevölkerung (wie z.B. Hochwuchs, Skoliose und Mitralklappenprolaps), zum anderen sieht man eine deutliche altersabhängige Entwicklung fast aller Merkmale mit einer durchschnittlichen Erstmanifestation zur Zeit der Pubertät. Während ein „marfanoider“ Habitus (Hochwuchs, unproportionale Körperformen und Dolichocephalie) nicht selten zu der voreiligen Diagnose eines MFS verleitet, kann bei einem MFS-Patienten andererseits dieses körperliche Erscheinungsbild auch fehlen und die Erkrankung übersehen werden. Bei ca. der Hälfte aller Ratsuchenden, die sich mit der Verdachtsdiagnose MFS in Spezialprechstunden vorstellen, wird die Diagnose nicht bestätigt (Rybczynski 2008).

Eine Reihe weiterer Erkrankungen des Bindegewebes kann mit Mutationen im *FBN1*-Gen assoziiert sein, die als Typ-1-Fibrillinopathien bezeichnet werden (Collod-Bérout 1998). Diese Erkrankungen zeigen in ihren Symptomkomplexen z. T große Überlappungen mit dem „klassischen“ MFS, erfüllen die Genter Diagnosekriterien (DePaepe 1996) jedoch nicht vollständig und machen eine klare Abgrenzung oft schwierig. Es wurden *FBN1*-Mutationen bei Patienten bzw. Familien mit isolierter Ektopia lentis gefunden, die weder kardiovaskuläre noch skelettale Manifestationen zeigten (Adès 2003). Auch alleinige skelettale „marfanoide“ Manifestationen, konnten in einigen Studien mit Mutation im *FBN1*-Gen nachgewiesen werden (Hayward 1994/ Milewicz 1995/ Adès 2002). Aber auch eine Dilatation oder Dissektion der Aortenwurzel kann bei Patienten auftreten, ohne dass ein MFS nach den Kriterien der Genter Nosologie vorliegt (Furthmayr 1997/ Milewicz 1996/ Franke 1995/ Körkkö 2002 und Ergebnisse dieser Arbeit). Insgesamt dürfen *FBN1*-Mutationen eine seltene Ursache für isolierte Aortenaneurysmata darstellen. Die wichtigsten Differentialdiagnosen des Marfan-Syndroms folgen im tabellarischen Überblick:

**Neonatales Marfan-Syndrom (nMFS):**

- besonders schwerwiegende klinische Manifestationen bereits bei Geburt
- Phänotyp: Kontrakturen der peripheren Gelenke, charakteristische Knautschohren (engl.: crumpled ears), laxe u. redundante Haut, pulmonales Emphysem, „greisenhafte“ Fazies (Milewicz 1994)
- Kinder versterben zu 76-100% innerhalb des ersten Lebensjahres an den Folgen einer Herzinsuffizienz (bei kombinierter Mitral- und Trikuspidalklappeninsuffizienz), auch bei dilatierter Aorta sind nicht Dissektion und Ruptur der Aorta Haupttodesursache

**Homozystinurie:**

- autosomal rezessiv vererbte Stoffwechselerkrankung
- ähnliche skelettale Merkmale wie MFS, zudem Ektopia lentis möglich
- geistige Retardierung, vermehrte Thromboseneigung (nicht typisch für MFS)
- immer auch Aminosäureanalyse des Urins bei V.a. MFS durchführen, da bei frühzeitiger Diagnose Homozystinurie durch geeignete Therapie behandelt werden kann

**Beals-Hecht-Syndrom (congenital contractural arachnodactyly = CCA):**

- autosomal dominant vererbte, kongenitale kontraktuelle Arachnodaktylie
- Mutationen im *FBN2*-Gen, Chromosom 5 (Beals u. Hecht 1971)
- Prävalenz 1:50.000, damit seltener als MFS
- auffällige Form der Ohrmuscheln, typische Kontrakturen, okuläre und kardiovaskuläre Manifestationen selten (in der Literatur wird ein Patient mit CCA und Dilatation der Aorta beschrieben (Gupta 2002))

**Shprintzen-Goldberg-Syndrom (SGS):**

- Phänotyp mit Kraniosynostosis, Exophthalmus, hypoplastischer Kiefer, Arachnodaktylie, Kamptodaktylie, Hernien, muskuläre Hypotonie, geistige Retardierung, Deformation des Thorax, Mitralklappenprolaps und Dilatation der Aortenwurzel (Shprintzen u. Goldberg 1982/ Adés 1995/ Sood 1996)
- Zusätzlich Hypertelorismus, antimongoloide Lidachse, hoher u. schmaler Gaumen, Mikrognathie, tief ansetzende und nach hinten rotierte Ohren (Robinson 2005)
- Molekulare Ursache bisher unklar, Diagnose erfolgt klinisch
- In Literatur wurde bei einem Patienten eine *FBN1*-Mutation nachgewiesen, es bleibt aber unklar, ob diese zur Expression des gesamten SGS-Phänotypes beigetragen hat (Sood 1996)

**Weil-Marchesani-Syndrom (WMS):**

- Phänotyp: Kleinwuchs, Brachydaktylie, Steifheit der Gelenke, Ektopia lentis, Myopie und Glaukom
- Heterogene Erkrankung, da es sowohl eine autosomal dominante Form aufgrund von Mutationen im *FBN1*-Gen gibt, als auch eine autosomal rezessive Form mit Mutationen im *ADAMTS10*-Gen (19p13.3-p13.2), OMIM #277600 (Faivre 2003).

**Ehlers-Danlos Syndrom Typ IV (EDS):**

- autosomal dominant, *COL3A1*-Gen, kodiert Polypeptidkette des Kollagen Typ III
- Gefahr Dissektion und Ruptur der Aorta führt zu verkürzten Lebenserwartung, auch andere große Arterien, der Darm und der gravide Uterus können rupturieren (McGookey u. Milewicz 1998)

**Loeys-Dietz-Syndrom (LDS):**

- Gen: *TGFBR1* (9p33) und *TGFBR2*- (3p22), OMIM #609192 (Typ 1A), #610380 (Typ 2B), #610168 (Typ1B), #608967 (Typ 2A)
- autosomal dominant, variable Expressivität
- Dilatation der Aortenwurzel bzw. –dissektion, ähnliche Manifestationen im Skelettsystem wie bei MFS, Duraektasie, zusätzlich noch kraniofaziale Fehlbildung (Hypertelorismus, Kraniosynostose, Gaumenspalte, Uvula bifida), Schlingelung von Arterien, Aneurysmata nicht nur bei Aorta, bisher keine EL beschrieben, Haut neigt zur atrophischen Narben- und Hämatombildung
- LDS-Subtyp mit Ähnlichkeit zum vaskulären Typ des Ehlers-Danlos-Syndrom, ohne typische Veränderungen im Typ-III-Kollagen, keine Mutationen im *COL3A1-Gen*
- bei beiden Formen zeigen Aortenaneurysmata aggressive Verlaufsformen, sie neigen auch ohne deutliche Dilatation zur Dissektion (Loeys 2005 u. 2006)

*Tabelle 1.2: Differentialdiagnosen des Marfan-Syndrom*

### 1.3. Fibrillin-1

#### 1.3.1. Struktur und Funktion

Das Fibrillin-1 Gen (*FBN1*) überspannt eine Länge von ungefähr 235kb genomischer DNA (Biery 1999), ist in 65 kodierende Exone und 3 nicht kodierende, 5`gelegene Exone fragmentiert und befindet sich auf dem langen Arm von Chromosom 15 (15q21.1) (Kainulainen 1990). 1991 konnte erstmals eine Punktmutation bei einem Patienten mit „klassischem“ MFS im *FBN1*-Gen nachgewiesen werden (Dietz 1991).

Fibrillin-1 wurde erstmals 1986 aus humanen Fibroblastenkulturen isoliert. Mit Hilfe spezifischer, monoklonaler Antikörper konnte die ubiquitäre Verteilung im elastischen und nicht elastischen Bindegewebe gezeigt werden (Sakai 1986). Es wird als 350kD schweres Profibrillin-1 synthetisiert und posttranslational während der Sekretion in die extrazelluläre Matrix (EZM) durch proteolytische Spaltung zu reifem 320kD schweren Fibrillin-1 umgewandelt. Dieses bildet den Hauptbestandteil der extrazellulären 10-12nm Mikrofibrillen (Milewicz 1992). Mikrofibrillen übernehmen wichtige Aufgaben in der EZM, so ermöglichen sie zum einen eine Umverteilung der Belastung zwischen elastischen Fasern, zum anderen können sie als eine Art strukturelle Verankerung dienen. Fibrillin-1 ist ein zysteinreiches Glykoprotein, deren Monomere eine Länge von 148nm haben und sich während der Polymerisation in einer „Kopf zu Schwanz“-Orientierung ausrichten (Sakai 1991). Neben einem Signal-Peptid lassen sich noch fünf weitere, strukturell verschiedene Regionen (A-E) unterscheiden (Pereira 1993). Die Regionen B und D setzen sich aus einer Reihe zysteinreicher Motive zusammen, die



Region A (Exon 1) enthält das ATG Startcodon für die Translation und kodiert für ein Signalpeptid. Es folgen noch 12, hauptsächlich basische Aminosäuren, deren funktionelle Bedeutung noch weitestgehend unbekannt ist. Möglicherweise kann Fibrillin-1 hier Moleküle mit sauren Valenzen, wie z.B. saure Proteoglykane in der EZM binden (Yin 1995).

Region B (Exon 2-10) beginnt mit einem Motiv aus 4 Zysteinen, das Ähnlichkeiten mit dem Fib-Motiv zeigt und daher Fib-4-Cys-Motiv genannt wird. Es folgen drei EGF-Motive und die ersten beiden calciumbindenden EGF-Motive, außerdem ein Derivat des Fib-Motives mit neun Zysteinen und das erste LTBP-Motiv.

Region C (Exon 10) ist wegen eines hohen Prolingehaltes (42%) von besonderem Interesse in Hinsicht auf die Mikrofibrillen-Zusammensetzung. Diese Region könnte als eine Art Scharnier im dreidimensionalen Raum agieren und es den Fibrillin-1 Monomeren ermöglichen, sich bei der Zusammensetzung der Mikrofibrillen in einer „Kopf-Schwanz“ Orientierung auszurichten (Pereira 1993, Yin 1995).

Region D (Exon 11-63) bildet den größten Abschnitt im Fibrillin-1 und erstreckt sich über 2240 Aminosäuren (AS), die mit einem nicht kalziumbindenden EGF-Motiv und 41 kalziumbindenden EGF-Motiven, sechs LTBP-Motiven und einem Fib-Motiv insgesamt 49 zysteinreiche, Motive bilden.

Region E (Exon 64-65) bildet den Carboxy-Terminus und zeigt eine ungewöhnliche Sequenz, mit zwei aufeinander folgende Zysteinreste in einem Bereich, der sowohl im Fibrillin-1 als auch im Fibrillin-2 hochkonserviert ist. Außerdem enthält diese Region auch noch einen Abschnitt mit mehreren basischen Aminosäuren, unter denen eine Konsensus-Sequenz von vier AS (RKRR) als Schnittstelle für zelluläre Proteasen fungiert, die für die Konvertierung des Profibrillins zu Fibrillin-1 verantwortlich sein soll (Milewicz 1995).

Im Rahmen des posttranslationalen Verarbeitungsprozesses des Fibrillin-1 sind auch Bereiche, an denen eine N-Glykosylierung stattfinden kann, von Bedeutung. Im gesamten Protein gibt es 14 dieser N-Glykosylierungs-Stellen, die größtenteils in der Region D liegen (Raghunath 1995). Außerdem enthalten alle 43 cbEGF-Motive eine Konsensus-Sequenz zur  $\beta$ -Hydroxylation eines Aspargin-Restes, die ebenfalls zur posttranslationalen Modifikation beiträgt (Glanville 1994).

### 1.3.2. Fibrillin -1, -2 und -3

Neben dem Fibrillin-1 konnten noch zwei weitere Fibrilline, das Fibrillin-2 und Fibrillin-3 identifiziert werden. Beide sind ebenfalls ein integraler Bestandteil der Mikrofibrillen der EZM und stimmen in ihrer Domänenstruktur mit derjenigen des Fibrillin-1 weitgehend überein. Fibrillin-2 befindet sich auf Chromosom 5 (5q23-q31) und scheint für die richtige Ausbildung der Extremitäten von Bedeutung zu sein (Zhang 1994). Mutationen im Fibrillin-2-Gen führen zu den skelettalen Merkmalen der CCA (Putnam 1995). Fibrillin-3 ist auf Chromosom 19 (19p13.3-p13.2) lokalisiert und umfasst mit 66 Exonen ca. 85kb (Corson 2004).

Alle drei Fibrilline zeigen eine hohe Übereinstimmung der Aminosäuresequenz, mit einer vollkommenen Konservierung der Zysteinreste. Fibrillin-2 scheint vor allem während der fetalen Entwicklung exprimiert zu werden und damit eher an der Morphogenese und Differenzierung teilzuhaben, während Fibrillin-1 später in fetalen und v.a. in postnatalen Geweben nachgewiesen werden kann und eher für strukturelle Funktionen verantwortlich zu sein scheint (Corson 2004). Auch die Fibrillin-3 Expression war besonders stark in fetalen Geweben, wie Lunge, Gehirn und Niere nachweisbar, während andere fetale Gewebe und auch die adulten Gewebe eine deutlich niedrigere Expression zeigten. Interessanterweise scheint Fibrillin-3 nicht in den sonst fibrillinreichen Blutgefäßen exprimiert zu werden. Während Fibrillin-1 und 2 reichlich in Meningen und Gefäßen des ZNS nachzuweisen sind, findet man Fibrillin-3 im Kontrast dazu im Parenchym des ZNS (Corson 2004).

### 1.3.3. Die Rolle des Kalziums im cbEGF-Modul

Viele extrazelluläre Proteine mit verschiedensten biologischen Funktionen beinhalten Domänen die Ähnlichkeiten mit dem epidermalen Wachstumsfaktoren (EGF) zeigen. Viele dieser Proteine benötigen Kalzium für ihre biologischen Funktionen.

Das EGF-Modul ist das häufigste Motiv des Fibrillin-1. Es ist durchschnittlich 45 AS lang und enthält sechs hochkonservierte Zysteinreste die untereinander nach einem charakteristischen Muster Disulfidbrücken ausbilden (1-3, 2-4, 5-6). Neben diesen Disulfidbrücken bilden zwei „ $\beta$ -Faltblätter“ eine weitere wichtige Struktur-Komponente. Von den 47 EGF-Motive des Fibrillin-1 enthalten 43 eine Konsensus-Sequenz zur Kalziumbindung, die bis zum ersten Zysteinrest ( $C_1$ ) von  $D/N-X-D/N-E/Q-C_1$  und zwischen dem dritten und vierten Zysteinrest von  $C_3-X-D/N^*-X-X-X-X-Y/F-X-C_4$  gebildet

wird, wobei das Sternchen die Position für eine mögliche  $\beta$ -Hydroxylierung markiert (Handford 1991). In dieser Konsensus-Sequenz steht X für eine beliebige AS. Diese Positionen scheinen eine wichtige Rolle bei der Kalziumbindung zu spielen (Selander-Sunnerhagen 1992). Damit sind 19 der durchschnittlich 42 Aminosäurereste eines cbEGF-Moduls an der Kalziumbindung beteiligt, wobei die einzelnen Positionen entweder direkte Liganden für die Kalziumbindung darstellen oder eine indirekt stabilisierende Wirkung haben.

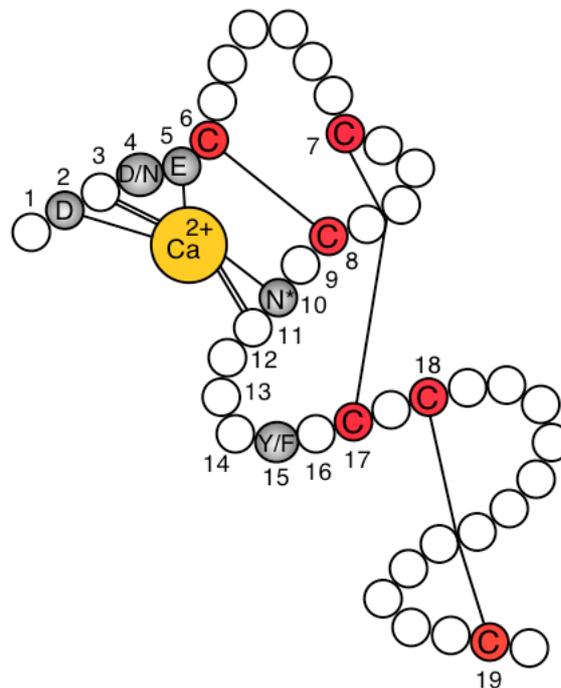


Abbildung 1.2: kalziumbindende EGF-Domäne

#### 1.4. *FBN1* Mutationen beim MFS

Der größte Teil der bis heute identifizierten Mutationen kommt nur bei den betroffenen Patienten bzw. der Familie vor. Auch wenn es eine klare Häufung von Mutationen in der Mitte des Gens gibt, sind krankheitserzeugende Mutationen über das gesamte Gen verteilt gefunden worden. Seit 1995 werden *FBN1* Mutationen in der UMD-*FBN1* Datenbank (<http://www.umd.be:2030>) erfasst, die inzwischen über 600 Mutationen beinhaltet. Es gibt sowohl Mutationen, die zu einem qualitativ veränderten Fibrillin-1 Protein führen, als auch Mutationen, die die verfügbare Menge des Proteins verändern. Am häufigsten sind Missense-Mutationen, die kalziumbindende cbEGF-Motive betreffen. Mutationen, die entweder einen der hoch konservierten Reste der cbEGF-

Motive betreffen oder zur Bildung eines zusätzlichen Zysteins führen, können wahrscheinlich die räumliche Struktur der jeweiligen Domäne verändern und damit die Gesamtstruktur und Funktion des Fibrillins negativ beeinflussen. Mutationen, die Reste der kalziumbindenden Konsensus-Sequenz betreffen, scheinen zu einer Reduzierung der kalziumbindenden Affinität zu führen und so eine Destabilisierung der cbEGF-Domänen zu verursachen (Downing 1996). Mutationen in cbEGF-Motiven, die weder Zysteine noch die kalziumbindenden Konsensus-Sequenz betreffen, sind selten. Es wurde vermutet, dass sie intra- und intermolekulare Interaktionen beeinflussen (Collod-Bérout 1998).

## **1.5. Theorien über die Pathogenese des Marfan-Syndroms**

Eine umfassende Theorie über die pathogenetischen Vorgänge beim MFS, die zum einen die Entwicklung der vielfältigen Manifestationen in den verschiedenen Organsystemen und zum anderen die intra- und auch interfamiliäre Variabilität der Merkmale erklären könnte, ist bis heute nicht bekannt. In den letzten Jahren sind verschiedene Theorien zur molekularen Pathogenese vorgeschlagen worden.

### **1.5.1. Der dominant negative Effekt**

Grundsätzlich führt der dominant negative Effekt dazu, dass das Produkt des mutierten Allels die Funktion des Wild-Typ Genproduktes beeinflusst, indem es deren Funktion behindert oder antagonisiert. Große Aggregate, die sich aus vielen Proteinen zusammensetzen, wie z.B. die Mikrofibrillen, scheinen besonders anfällig auf Defekte in den Monomeren zu reagieren (Herskowitz 1987). Die Formation der Fibrillin-Aggregate scheint von der passenden Konformation der beteiligten Monomere abhängig zu sein. Mutierte Monomere könnten in die mikrofibrillären Aggregate eingebaut werden, um diese dann in Bezug auf proteolytischen Abbau oder durch mikrofibrilläre Dysfunktion zu destabilisieren (Robinson 2001). In einer Studie an dermalen Fibroblastenkulturen wurde das mutierte Allel eines Patienten mit schweren klinischen Manifestationen des MFS in normalen Fibroblasten exprimiert. Vor dem Hintergrund von zwei normalen Allelen war dieses mutierte Allel dennoch in der Lage, die Formation der Mikrofibrillen erheblich zu stören und auf zellulärer Ebene einen MFS Phänotyp zu produzieren (Eldadah 1995).

### 1.5.2. Der Einfluss der Haploinsuffizienz auf die Pathogenese

Auch die Haploinsuffizienz soll zur komplexen Pathogenese des MFS beitragen (Judge 2004). Bei Mäusen mit zwei normalen Fibrillin-1 Allelen konnte durch die zusätzliche Einbringung eines mutierten Allels (mit der Mutation c.1663C>R, die mit dem MFS assoziiert ist) weder ein klinischer, noch ein zellulärer MFS Phänotyp ausgelöst werden. Es kam sogar zu Interaktionen des mutierten Fibrillin-1 mit dem normalen endogenen Maus-Fibrillin-1 und einem aktiven Einbau in die Mikrofibrillen. Mäuse die im Vergleich dazu heterozygot für eine vergleichbare Missense Mutation (c.1039C>G) waren, zeigten jedoch skelettale und kardiale Manifestationen des MFS. Hiernach scheint eher eine reduzierte Dosis an Wildtyp Fibrillin-1, als die Produktion eines defekten Proteins, im Sinne eines dominant negativen Effektes, zur Pathogenese des MFS beizutragen. Interessanterweise konnten die kardialen Manifestationen der Mäuse, die für die Mutation c.1039C>G heterozygot waren, durch die Einbringung transgener WT-*FBN1*-DNA deutlich positiv beeinflusst werden (Judge 2004).

### 1.5.3. Fibrillin-1 Mutationen und die Gewebshomöostase

Fibrillin-1 scheint bei der Bildung elastischer Fasern als eine Art Gerüst für das Elastin zu fungieren, und damit eine wichtige Rolle während der Elastogenese zu spielen. Ergebnisse aus Studien mit *FBN1*-transgenen Mäusen deuteten jedoch darauf hin, dass sich elastische Fasern auch ohne die Hilfe normaler Mikrofibrillen formieren können und Fibrillin-1 in erster Linie an der Aufrechterhaltung der Homöostase des elastischen Bindegewebes beteiligt ist (Pereira 1997). Die Dilatation der Aorta bei MFS Patienten soll primär durch den Verlust der Zugfestigkeit in der Adventitia hervorgerufen werden, da diese dem hämodynamischen Stress nicht standhält. Die Zerstörung des elastischen Netzwerkes in der Media, mit darauf folgender Dissektion und Ruptur soll ein daraus resultierendes, sekundäres Ereignis sein (Pereira 1997). Es wird angenommen, dass es zu kardiovaskulären Komplikationen kommt, nachdem die Anzahl an funktionsfähigen Mikrofibrillen eine bestimmte, kritische Schwelle unterschritten hat (Ramirez 1999). Diese Schwelle scheint eine gemeinsame Endstrecke von diversen *FBN1* Mutationen darzustellen, die verschiedene Kombinationen von Fibrillin-1 Synthesedefekten, Störungen der mikrofibrillären Zusammensetzung, oder fortschreitenden Abbau der Mikrofibrillen in den Geweben verursachen.

#### 1.5.4. Die Rolle der Proteolyse in der Pathogenese des MFS

Kalziumbindung ist wichtig für die Organisation und Integrität der Mikrofibrillen (Kielty 1993). Einerseits schützt Kalzium Wildtyp Fibrillin-1 gegen proteolytischen Abbau (Reinhard 1997a), andererseits können *FBN1* Mutationen die Affinität zu Kalzium in den cbEGF-Motiven reduzieren und so die Anfälligkeit der Fibrillin-1 Proteine gegenüber Proteolyse erhöhen (Reinhard 2000/ Booms 2000). Eine verminderte Kalziumbindung könnte sterische Hindernisse reduzieren und dadurch enzymespezifische, kryptische (sonst verborgener) Schnittstellen freilegen. Das Protein wird dadurch gegenüber verschiedenen Proteasen anfälliger (Reinhard 2000/ Booms 2000, Robinson and Booms 2001). Auch der betroffene mutierte Rest im cbEGF-Motiv und die Lage des Motivs im Protein scheinen von Bedeutung zu sein (Booms 2000).

Matrix-Metalloproteinasen (MMP) können Mikrofibrillen abbauen (Ashworth 1999). Bei der Pathogenese abdominalen Aortenaneurysmen (AAA) konnte einerseits eine MMP-Hochregulation nachgewiesen werden, andererseits konnte die Entwicklung von AAAs bei Ratten pharmakologisch durch die Gabe von MMP-Inhibitoren erfolgreich verhindert werden (Curci 1998a/b). Eine Hochregulation der MMPs konnte zusätzlich in Präparaten der Aorta nachgewiesen werden, die MFS Patienten bei chirurgischen Interventionen entnommen wurden. Besonders hohe Konzentrationen fand man in glatten Muskelzellen, die sich in unmittelbarer Nähe zu Medianekrosen befanden (Segura 1998). Vor diesem Hintergrund postulierten Booms et al. (2000), dass möglicherweise schon geringe Konzentrationen an proteolytischen Abbauprodukten von Fibrillin oder anderen mikrofibrillären Proteinen, die durch *FBN1*-Mutationen hervorgerufen werden, ein frühes Ereignis in der Pathogenese der Aortendissektion beim MFS darstellen können. Diese Fragmente sollen im Gegensatz zu intakten Molekülen über die Induktion einer intrazellulären Signalkette die Expression von Matrix-Metalloproteinasen oder anderen Proteinase in Zellen, wie den glatten Muskelzellen der Media erhöhen, die wiederum proteolytisch wirksam sind und damit die Konzentration an Proteinfragmenten weiter erhöhen und so einen Circulus vitiosus bilden (Booms 2000). Später konnten Booms et al. nachweisen, dass rekombinante Fibrillin-1 Fragmente, die ein Arginin-Glycin-Asparaginsäure-(RGD)Motiv enthielten, *in vitro* eine signifikante Erhöhung der MMP-1 und MMP-3 Expression induzieren (Booms 2005). Zusätzlich konnte durch biochemische und bioinformatische Analysen gezeigt werden, dass ein, das Elastin-Bindungsprotein-Motiv GxxPG enthaltendes Fibrillin-1-

Fragment die Expression und Produktion der MMP1 auf das Neunfache hochregulieren kann (Booms 2006). Damit wären Proteaseinhibitoren eine mögliche therapeutische Strategie bei MFS Patienten, wenn *in vivo* Studien diese Ergebnisse bestätigen würden (Booms 2005). In einer neueren Studie konnte im mgR-Mausmodell durch den unspezifischen MMP-Inhibitor Doxyzyklin ein verlängertes Überleben und ein Rückgang der Degeneration der EZM gezeigt werden, zudem kam es zu niedrigeren MMP-Spiegeln im Gewebe (Xiong 2008).

#### **1.5.5. Induktion der Makrophagenchemotaxis durch Fibrillin-1 Fragmente**

Auch eine Entzündungsreaktion in der Tunica media der Aortenwand soll zur komplexen Pathogenese des MFS beitragen. Sowohl Aortenextrakte aus dem mgR-Marfan-Mausmodell, als auch Fibrillin-1 Fragmente, die eine Elastin-bindendes-Protein (EBP)-Erkennungssequenz enthalten, bewirkten einen chemotaktischen Reiz auf Makrophagen im Vergleich zu Kontrollen und können damit die beobachteten inflammatorischen Infiltrate in der Media erklären (Guo 2006)

#### **1.5.6. Eine gestörte Regulation der TGF- $\beta$ Aktivierung scheint zur Pathogenese des MFS beizutragen**

Fibrillin-1 scheint nach neueren Daten zusätzlich einen regulatorischen Einfluss auf das Zytokin Transforming Growth Faktor Beta (TGF- $\beta$ ) auszuüben. TGF- $\beta$  ist ein multifunktionaler Wachstumsfaktor, der über transmembranöse Serin-Threonin-Kinase Rezeptoren und intrazelluläre Signalmoleküle der Smad-Familie eine Signaltransduktion vermittelt und so unter anderem Proliferation, Zellzyklusarrest, Differenzierung, Apoptose, Inflammation, Zellmigration, Adhäsion und Matrix-Synthese induzieren kann. Die biologischen Effekte sind vom Kontext abhängig und variieren mit dem Gewebetyp und der Aktivierung anderer intrazellulärer Signalwege (Akhurst 2004). Defekte der TGF- $\beta$  Funktion führen zu Tumorwachstum, Fibrose und Autoimmunerkrankungen (Annes 2003). TGF- $\beta$  wird als Propolypeptid synthetisiert und im Golgi-Apparat in ein TGF- $\beta$ -Dimer und ein Propeptid gespalten. Beide bilden das so genannte „Latency assoziiated Protein“ LAP, TGF- $\beta$  ist in dieser Form inaktiv. LAP bindet an LTBP (latent TGF- $\beta$  binding protein). LAP und LTBP bilden zusammen einen Komplex, der „Large Latent Complex“, LLC genannt wird. LLC bindet extrazellulär an

die EZM. Die LTBP1s sind strukturell mit Fibrillin verwandt und der LLC bindet extrazellulär an Fibrillin-1. Die N-terminale Domäne des Fibrillin-1 bindet LTBP1 über eine Region an dessen c-terminalen Ende. In dieser Konfiguration kann der Komplex auf spezifische Signale aus der EZM mit der Freilassung und Aktivierung von TGF- $\beta$  reagieren. Er fungiert so als Sensor und antwortet auf Schäden in der EZM (Annes 2003).

Eine Studie am Maus-Modell (Fibrillin-1 defiziente Mäuse) konnte zeigen, dass eine verstärkte TGF- $\beta$ -Aktivierung entscheidend zur Pathogenese des MFS beitragen kann. Durch verstärkte Freisetzung von TGF- $\beta$  kam es während der Lungenentwicklung der Mäuse zu Apoptose und Behinderung der Proliferation, wodurch die Entwicklung der alveolaren Septen stark gestört wird. Neutralisierende TGF- $\beta$  Antikörper konnten diese Störung in der Entwicklung wieder aufheben. Der Verlust an Mikrofibrillen scheint den gezielten Einbau (Sequestration) der LLC zu beeinflussen und TGF- $\beta$  wird leichter für eine Aktivierung erreichbar. Dies wird durch die erhöhten TGF- $\beta$  Spiegel unterstrichen, die in den Lungen dieser Mäuse gemessen werden konnten. Mäuse mit zwei Wildtyp-Allelen zeigten im Vergleich keine erhöhten Spiegel (Neptune 2003).

Fibrillin-1 hat damit eine Schlüsselrolle in der Regulation der TGF- $\beta$  Aktivierung und dessen lokaler Konzentration. Es interagiert mit LTBP1, um die Aktivität des TGF- $\beta$  zu kontrollieren. Dadurch kommt es zu einer limitierten Freigabe von TGF- $\beta$ . Der Verlust an Mikrofibrillen durch mutiertes Fibrillin-1 führt durch Freigabe aus der Matrix zu einem exzessiven Anstieg an aktiviertem TGF- $\beta$ . Über welchen genauen Mechanismus Fibrillin-1 die TGF- $\beta$  Aktivität kontrolliert, ist jedoch unbekannt (Kaartinen und Warburton 2003).

Auch der direkte Zusammenhang von verstärkter TGF- $\beta$ -Signaltransduktion und der Entwicklung von Aortenaneurysmen konnte gezeigt werden (Habashi 2006). Zusätzlich sahen Habashi und Mitarbeiter, dass der Angiotensin-II-Rezeptor-1-Blocker Losartan, einen inhibierenden Effekt auf die TGF- $\beta$  Signaltransduktion ausübt, und so zu einer vollständigen Regredienz bei bereits bestehenden Aortenaneurysmen im MFS-Mausmodell führte. Damit spielen nicht nur primär strukturelle Störungen des Bindegewebes, sondern auch sekundäre Veränderungen im Stoffwechsel der EZM eine wesentliche Rolle in der Pathogenese des MFS.

## 2. Fragestellung der Arbeit

Zur Untersuchung von Genotyp-Phänotyp-Korrelationen beim Marfan-Syndrom wurde ein Screening aller 65 kodierenden Exone des *FBN1*-Gens durchgeführt.

Ausgenommen waren die Exone am 3´Terminus (Exon 59-65), die bereits im Rahmen einer weiteren Dissertation untersucht worden waren.

Für jedes einzelne Exon wurden Primer entwickelt und die Bedingungen für PCR und TGGE optimiert. Getestet wurde eine große heterogene Patientenpopulation (n=126), die nicht nur aus Patienten mit gesichertem MFS bestand, sondern auch Patienten mit fraglichem MFS beinhaltete, welche die Kriterien der Genter Nosologie nicht erfüllten. Außerdem gehörten ebenfalls Patienten zur Screeninggruppe, die Erkrankungen aufwiesen, die mit *FBN1* Mutationen assoziiert sind, wie beispielsweise isolierte thorakale Aortenaneurysmen.

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Auswertung der gefundenen *FBN1* Mutationen und deren Vergleich mit weiteren Mutationen aus der Literatur zur Identifikation möglicher Genotyp-Phänotyp-Korrelationen in Hinblick auf ein besseres Verständnis der molekularen Pathogenese des Marfan-Syndrom und der Typ-1-Fibrillinopathien, sowie der Physiologie der fibrillin-beinhaltenen Mikrofibrillen.

## 3. Material und Methoden

### 3.1. Material

#### 3.1.1. Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien besaßen den Reinheitsgrad pro analysi.

<b>Chemikalien</b>	<b>Hersteller</b>
Acrylamid/N,N'-Methylenbisacrylamid-Lösung	Roth, Karlsruhe
Agarose	Gibco BRL, Eggenheim
APS	Merck, Darmstadt
Aqua ad iniectabilia	Braun
Borsäure	Merck, Darmstad
Bromphenolblau	Sigma
EDTA	Merck, Darmstadt
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Merck, Darmstadt
Formaldehyd 37%	Sigma,
Glycerin 40%	Merck, Darmstadt
Harnstoff	Roth, Karlsruhe
IGEPAL®CA-630	Sigma
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Mineralöl	Sigma,
MOPS	Merck, Darmstadt
NaCl	Roth, Karlsruhe
NaOH	Merck, Darmstadt
Natriumcarbonat	Merck, Darmstadt
PBS (Fertigpulver)	Biochrom KG
Phenol	Roth, Karlsruhe
SDS	Roth, Karlsruhe
Silbernitrat	Merck, Darmstadt
TEMED	Serva
Tris	Merck, Darmstadt
Triton® X-100 (Polyethylenglykol)	Merck, Darmstadt
Xylen-Cyanol	Serva

### 3.1.2. Puffer

<u>Puffer</u>	<u>Hersteller</u>
Ladepuffer für Agarosegel (blau/orange; 6x)	Promegea
Enzymverdünnungspuffer mit Glycerin	Amersham
Glycerintoleranter Sequenzgelpuffer 20x	USB
Mn-Puffer (0,1M MnCl <sub>2</sub> )	Amersham
NE-Puffer 4 (10x)	New England BioLabs Inc.
T7-Sequenase-Reaktionspuffer (5x)	Amersham
Taq-DNA-Polymerase-Puffer (10x)	Pharmacia Biotech

### 3.1.3. Sonstige Lösungen

<u>Lösungen</u>	<u>Hersteller</u>
DTT-Lösung 0,1M	Amersham
Ethidiumbromidlösung 1%	Roth
Formaldehyd-Lösung 37%	J.T.Baker
Gel 30® (Acrylamid/Bisacrylamid=30/0,8)	Roth
HCl (37%)	Merck
Salpetersäure (65%)	Merck
Stop-Lösung	Amersham

### 3.1.4. Enzyme

<u>Enzym</u>	<u>Hersteller</u>
Anorganische Pyrophosphatase (5U/ml)	Amersham
Proteinase K (10µg/µl)	Boehringer Mannheim GmbH
Taq-DNA-Polymerase (5U/µl)	Pharmacia Biotech
T7 Sequenase (13U/µl)	Amersham

#### Restriktionsenzyme

*Mae* III (GTNAC), *Msp* I (C/CGG), *Rsa* I (GT/AC), *Hph* I (GGTGA(8/7)), *Mse* I (T/TAA)  
*Sty* I (CC[A/T] [A/T]GG), *Bmy* I (GDGCH/C), *Taq* I (T/CGA), *Sau*3A I (I/GATC), *Xcm* I  
(CCANNNNN/NNNNTGG)  
Alle: New England BioLabs Inc.

### 3.1.5. Oligonukleotid Primer, Mononukleotide, Radionuklide

<u>Oligonukleotid Primer</u>	<u>Hersteller</u>
Primer ohne Modifizierung	MWG, Eurogentec
- mit Psoralen-Modifizierung	MWG, Eurogentec
- mit Biotin-Modifizierung	MWG, Eurogentec

<u>Mononukleotide/Radionuklide</u>	<u>Hersteller</u>
ddNTPs mit 7-deaza-dGTP (je 80 µM)	Amersham Kit
dNTP-Markierungs-Mix mit 7-deaza-dGTP (je 80µM ) für <sup>35</sup> S-dATP	Amersham Kit
dNTPs (je 100 mM)	Pharmacia Biotech, InViTek
dATP mit S <sup>35</sup> markiert	NEN Life Science Products
ABI Prism BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit	Applied Biosystems, USA

### 3.1.6.DNA, DNA-Marker und Andere

#### Patientenproben:

B-Gruppe (Deutschland)	n=63
D-Gruppe (National Eye Clinic, Hellerup, Dänemark)	n=63

#### DNA-Marker Hersteller

PhiX174 DNA/Hae III Digest	Promega
----------------------------	---------

#### Magnetische Kugel Hersteller

Dynabeads® M-280 Streptavidin	Dynal
-------------------------------	-------

### 3.1.7.Geräte und Zubehör

<u>Geräte/Zubehör</u>	<u>Hersteller</u>
ABI Big Dye Terminator Cycle Sequenzierer	ABI Weiterstadt Germany
Autoradiographiefilme	NEN Life Science Products
Entwicklungsgerät für Autoradiographiefilme	Kodak
Filter	Schleicher & Schuell
Gelkammer für Agarosegele	MWG Biotech
Gelblottingpapier	Schleicher & Schuell
Inkubator	Memmert
Kassetten für Autoradiographiefilme	Kodak
Konzentrator für magnetische Teilchen	Dynal
Mittelwellen-UV-Lampe (365nm)	UV Produkte
PCR-Geräte (Thermocycler)	Eppendorf, Techne
Photometer	Pharmacia Biotech
Pumpe für Geltrockengerät	Savant
Saran®-Folie	Dow Chemical Company
Schüttler	Janke & Kunkel
Sequenzgelgeräte	Hybaid
Stromversorgungsgeräte	Bio-Rad, MWG-Biotech
TGGE-Gelkammer	Diagen
Thermopapier (Agarosegel-Fotos)	Mitsubishi
Umwälzthermostate	Techne
UV-Transilluminator	UVP
Vakuumtrockner	Savant
Videokamera (Agarosegel-Fotos)	Herolab
Vortex-Gerät	Scientific Industries
Zentrifugen	Beckman, IEC
<u>Zubehör Sequenzierung:</u>	
Glasplatten, Kamm, <i>Spacer</i>	MWG
<u>Zubehör TGGE:</u>	
Folien, Glasplatten, <i>Spacer</i> , <i>Ultrawicks</i>	Diagen
<u>Zubehör Zellkultur:</u>	
Kulturflaschen, Röhrrchen, Gefäße	Falcon, Eppendorf, Nunc

## 3.2. Methoden

### 3.2.1.Zellkultur

Es wurde Dulbeco Minimal Essential Medium (MEM) verwendet. Dieses Medium enthält 5mM Glutamax (stabile Form von Glutamin), 10% FCS (fetales Kälberserum) und Carbonatpuffer mit Phenolrot als pH-Indikator (gelb bei pH unter 7) und zusätzlich noch ein Penicillin-Streptomycin-Gemisch. Zum Auftauen von eingefrorenen Fibroblasten wird das Medium im 37°C Wasserbad erwärmt. Arbeitsfläche und Material sollten desinfiziert bzw. sterilisiert werden. Die Fibroblasten werden bei -80°C in flüssigem Stickstoff gelagert. Das aufzutauende Kyroröhrchen wird mit einer Pinzette gehalten und in einem 37°C Wasserbad vollständig aufgetaut. Für jedes Kyroröhrchen müssen zwei T25-Kulturflaschen verwendet werden. Die Außenseite des Röhrchens wird mit Barrycidal-Spray gut desinfiziert und rasch unter die Sterilbank gebracht. Es werden je 4ml des auf 37°C vorgewärmten Mediums und je 0,75ml Zellsuspension in die T25-Kulturflaschen gegeben und sachte geschwenkt. Die Zellen werden zwischen 12h und 24h bei 37°C in einem Begasungsschrank in einer Atmosphäre von 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Es folgt ein Mediumwechsel. Hierfür wird der Schlauch der Vakuumpumpe mit Essigsäure durchgespült und das Medium dann mit einer sterilen, abgeflachten Pasteurpipette abgesaugt, dabei die Kulturflasche leicht schräg halten und die Pipette in die unterste Ecke einführen, ohne den Boden zu berühren. Nun werden 10ml des vorgewärmten Mediums einpipettiert, wobei die Pipette bis unter den Falschenhals eingeführt werden muss.

### 3.2.2.Isolierung genomischer DNS aus Fibroblasten

Zum Trypsinieren der Fibroblasten wird als erstes das Medium aus zwei TC-75 Flaschen mit einer Pasteurpipette abgezogen. Daraufhin wird jede Flasche mit 10ml kaltem PBS (Phosphate-buffered saline) gewaschen, um dann den Boden beider Flaschen mit je 2,5ml Trypsin/EDTA-Lösung zu bedecken. Diese Lösung enthält weder Ca<sup>2+</sup> noch Mg<sup>2+</sup> und setzt sich zusammen aus: 0,05% Trypsin, 0,02% EDTA, 10x PBS (pH 7,4), 85mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 15mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1,37M NaCl, 30mM KCl als 10x Stammlösung. Die Stammlösung wird 1:10 mit ddH<sub>2</sub>O verdünnt. Nach ca. fünf Minuten Inkubation bei 37°C lösen sich die Zellen (weiß-grauen Schleier) und werden in 10ml PBS resuspendiert und in 50ml Falcon-Bluecap-Röhrchen überführt. Um das Trypsin zu verdünnen, wird mit PBS auf ca. 50ml aufgefüllt. Das Röhrchen wird 4 Minuten bei

1000U/min und Raumtemperatur (RT) zentrifugiert und der Überstand mit der Pasteurpipette abgezogen. Das Zellpellet wird nun in zwei Durchgängen jeweils mit 5ml kaltem PBS gewaschen, zentrifugiert und der Überstand verworfen. Zum Lysieren und Verdauen der Zellen wird das Zellsediment in TE-Puffer (100mM Tris-HCl (pH 8,0), 10mM EDTA) aufgenommen, wobei für  $5 \times 10^7$  Zellen 1ml TE-Puffer verwendet wird. Die Zellsuspension wird in einen Erlenmeyerkolben überführt, 10ml Extraktionspuffer (10mM Tris-HCl, 100mM EDTA, 20µg/ml RNAse A, 0,5% SDS) werden dazugegeben und das Ganze wird eine Stunde auf dem Schüttler bei 37°C inkubiert. In den Ansatz werden pro ml 100µg Proteinkinase K gegeben und drei weitere Stunden bei 55°C inkubiert. Zur Proteinfällung wird die Suspension auf RT heruntergekühlt und in ein Falcon-Bluecap-Röhrchen überführt. Zur Extraktion wird 1 Vol. Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Lösung zugegeben und durch vorsichtiges Mischen eine Emulsion gebildet. Dann wird bei RT 15 Minuten mit 3000U/min zentrifugiert. Damit die DNS nicht in die Interphase zwischen organischer und wässriger Phase eingeschlossen wird, muss die Phenollösung einen pH von 8,0 haben. Es wird daher ggf. mit 0,5M Tris-HCl an den pH angleichen. Nach der Zentrifugation wird die wässrige Phase mit einer Pipette abgenommen, ohne die Interphase zu berühren und in ein sauberes Falcon-Bluecap-Röhrchen überführt. Danach wird die Phenolextraktion einmal wiederholt. Anschließend wird mit Chloroform extrahiert. Dazu wird 1 Vol. Chloroform zugegeben und ebenfalls 15 Minuten bei 3000U/min und RT zentrifugiert. Der Überstand wird abgenommen und es werden 2 Vol. eiskaltes 100% Ethanol und 0,1 Vol 3M Natriumacetat zugegeben, um die DNS auszufällen. Die ausgefallene DNS wird dann bei 3000U/min und RT 15 Minuten zentrifugiert und das Pellet mit 70%igem Ethanol gewaschen. Es wird erneut für 10 Minuten unter gleiche Bedingungen zentrifugiert und danach das Ethanol vorsichtig abgegossen. Um das Pellet zu trocknen, wird das Röhrchen kopfüber aufgestellt bis der Alkohol verdunstet ist. Die DNS wird in 150µl TE-Puffer gelöst und die OD mit dem Photometer bestimmt.

#### **3.2.3. DNA-Extraktion aus EDTA-Blut**

Die EDTA-Blutprobe (ca. 3-20 ml) wird 1 zu 1 mit 1x PBS (phosphatgepufferte Natriumchloridlösung, Fertigpulver gelöst in 10l dd H<sub>2</sub>O) in ein 50ml-Falkon Röhrchen überführt. Die Lösung wird bei 3000 U/min 20 Minuten bei RT zentrifugiert und der Überstand (das Serum) abgegossen. Um die Erythrozyten zu lysieren wird ddH<sub>2</sub>O. dazu gegeben und die Lösung wird wieder zentrifugiert (RT, 3000U/min, 30Min) und der

Überstand abgegossen. Dieser Arbeitsschritt wird so lange wiederholt, bis alle Erythrozyten lysiert und der Überstand klar ist. Zur Zerstörung der Leukozytenzellmembranen werden 20ml 0,1%iges IGEPAL® CA-630 (= nicht ionisches Detergenz) zugegeben, die Lösung sollte gut gemischt und zentrifugiert werden (10 Min., 2000 U/min, RT). Der Überstand wird verworfen. Zur Zerstörung der Zellkerne wird das Sediment in 8 ml Lysepuffer (pH 8,2 autoklaviert: 10mM Tris-HCl, 10mM NaCl, 10mM EDTA) aufgenommen und gut suspendiert. Nach Zugabe von 200µl 20%igem SDS (Natriumdodecylsulfat, 20%, pH 7,2) und 150µl Proteinkinase K (10mg/ml) wird erneut gut gemischt. Die Lösung sollte über Nacht in einem Wasserbad bei 37°C solange inkubiert werden, bis sie klar ist. Um die Proteine auszufällen werden 3ml 5M NaCl dazu gegeben, dann wird die Lösung 15 Sekunden lang kräftig geschüttelt und zentrifugiert (10 Min., 2000 U/min, RT). Diesmal wird der Überstand in ein 15ml-Falkon-Röhrchen überführt und weitere 15 Minuten bei 3000 U/min und RT zentrifugiert. Dann wird der Überstand in ein 50ml-Falkon-Röhrchen überführt und zur DNS-Ausfällung wird ca. das Doppelte des Ausgangsvolumen an 100%iges Ethanol zugegeben. Die ausgefallene DNS (weiße Fäden) wird erneut zentrifugiert (15 Min., 3000 U/min, RT). Der Alkohol wird vorsichtig abgegossen und das Pellet wird mit 10ml 70%igem Ethanol gewaschen. Dann wird die Lösung erneut zentrifugiert (10 Min., 3000 U/min, RT), der Alkohol wieder vorsichtig abgegossen und das Falkon-Röhrchen kopfüber getrocknet. Die gewonnene DNS wird in 150µl ddH<sub>2</sub>O oder TE-Puffer (70%) über Nacht gelöst.

#### 3.2.4. Konzentrationsbestimmung der DNS

Die Konzentrationsbestimmung der DNS erfolgt mit einer Deuterium-Lampe über die Messung der optischen Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 260nm, da DNS hier ein typisches Extinktionsmaximum zeigt. Proteine haben ihr Extinktionsmaximum bei 280nm. Die Ratio der Extinktionen von Proteine und DNS zeigt die Reinheit der DNS an. Die Ratio 280nm:260nm sollte ungefähr zwischen 1,5-2,0 liegen, niedrigere Werte sprechen für einen hohen Proteinanteil und Verunreinigung. 5µl DNS-Lösung werden 1:200 mit 995µl ddH<sub>2</sub>O verdünnt und in 1ml Küvetten im Photometer gemessen. Zur Eichung wird vorher eine Messung mit 1ml Wasser durchgeführt.

Zur Berechnung der DNS-Konzentration gilt folgende Formel:  $c [\mu\text{g}/\mu\text{l}] = \text{OD}_{260} \times V \times F$  ( $\text{OD}_{260}$  = optische Dichte bei 260nm,  $V$ = Verdünnung (=200),  $F$ = Multiplikationsfaktor (dsDNA= 50))

DNS-Aliquots werden mit einer Konzentration von 200µg/µl bei -20°C gelagert.

### 3.2.5. Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die PCR ist eine in-vitro Technik, mit der man gezielt DNS-Abschnitte, die von zwei bekannten DNS-Sequenzen eingerahmt werden, vervielfältigen kann. Diese flankierenden Sequenzen sollten aus 15 bis 25 bekannten Basen bestehen, so dass zwei Oligonukleotide, die so genannten forward- und reverse-Primer, hergestellt werden können. Diese einzelsträngigen DNS-Moleküle, die basenkomplementär zu den flankierenden Sequenzen (template) sind, binden spezifisch an die Endpositionen des gewünschten Sequenzabschnittes (Primer-Hybridisierung). Eine DNS-Polymerase verlängert nun in Gegenwart von dNTPs die Primer entlang der einzelsträngigen denaturierten DNS-Matrize und synthetisiert so neue DNS-Stränge, deren Sequenz komplementär zur Matrize ist, so dass die Einzelstränge zu Doppelsträngen ergänzt werden (DNS-Synthese). Um die Synthese zu wiederholen, werden die Doppelstränge erneut durch Denaturierung bei 95°C getrennt und nach Abkühlung der Mischung an die Primer gebunden. Sobald die richtige Temperatur für die Enzymreaktion erreicht ist verlängert die DNS-Polymerase die Primer. Mit jedem neuen Zyklus steigt die Konzentration der vervielfältigten Ziel-Sequenzen an, da auch die neu synthetisierten DNS-Stränge als Matrize dienen. Befindet sich zwischen Primer-Bindungsstellen eine Mutation, überträgt sich diese auch auf das PCR-Produkt.

Die PCR-Ansätze wurden in einem Ansatzvolumen von 25µl durchgeführt:

2,5µl 10xTaq-Puffer (mit 1,5mM MgCl<sub>2</sub>), 1 µl DNS (200µg), 0,5µM je Primer (Hin und Rück), 2µl dNTP (2mM), 0,1 µl Taq-Polymerase (5U/µl), 17,9 µl ddH<sub>2</sub>O

Die PCR beinhaltet einen initialen Denaturierungsschritt bei 94°C über 5 Minuten, gefolgt von 40 Zyklen bei 94°C für 30 Sekunden, Annealing mit einer primerspezifischen Temperatur (T<sub>a</sub>) über 30 Sekunden und Elongation (DNS-Synthese) bei 72°C für 30 Sekunden. Es erfolgte kein abschließender Extensionsschritt. Für die TGGE wurden 40 PCR-Zyklen durchlaufen, was zu einem Nachlassen der Enzymaktivität der Polymerase in den letzten Zyklen führt. Während der Denaturierung entstehen weiterhin DNS-Einzelstränge, es kommt aber zu keiner Verlängerung mehr und die Einzelstränge renaturieren beim Abkühlen zu Homo- und auch zu den für die TGGE wichtigen Heteroduplexen.

### 3.2.6. Gel-Elektrophorese

Um ein 2%iges Agarosegel zu erhalten, in dem lineare DNS-Moleküle zwischen 0,1-2 kb effizient getrennt werden können, werden 2g Agarose in 100ml 1x TBE- Lösung (10x TBE-Puffer: 0,9M Tris-Borat, 20mM EDTA, 108g Tris, 55g Borsäure, 40ml 0,5 EDTA (pH 8,0), ad 1000ml ddH<sub>2</sub>O) in der Mikrowelle bei 600 Watt für ca. 5 Minuten aufgekocht. Dieser Mischung werden während des Abkühlens auf 60°C 5µl 1%ige Ethidiumbromidlösung (10mg/ml) zugegeben, um eine 0,05%ige Endverdünnung zu erreichen. Das noch flüssige Gel wird in eine horizontale Schiene gegossen und nach Erstarren in die Gelkammer, die mit mit 1x TBE-Lösung gefüllt ist, gespannt. Das Gel wird dann mit 5µl des PCR-Produktes und 2µl 6x Ladepuffer (blau/orange: 10% Ficoll® 400, 0,25% Bromphenolblau, 0,25% Xylencyanol, 0,4% Orange G, 10mM Tris-HCl (pH 7,5), 50mM EDTA) pro Tasche beladen. Die DNS wird nun bei 130V für 30-45min (ca. 10V/cm) im Gellauf getrennt. 4µl eines mitlaufenden DNS-Längenstandards (PhiX174DNA/Hae III Digest, 1mg/ml DNS) dienen zur Größenbestimmung der DNS-Fragmente, er liefert Fragmente von 72-1353bp, mit sieben Fragmenten im Bereich um 200bp. Nach dem Lauf wird das Ergebnis auf einem UV-Transluminator sichtbar gemacht und photographisch dokumentiert.

### 3.2.7. Temperatur-Gradienten-Gel-Elektrophorese (TGGE)

Für die TGGE wurde eine kommerziell erworbene Apparatur von DIAGEN mit horizontaler Heizplatte verwendet. Folgende Puffer wurden verwendet: 50x ME-Puffer (1M MOPS/ 50mM EDTA/ pH 8,0: 209,4g MOPS (3-[N-Morpholino]Propansulfonsäure), 18,6g EDTA, 36g NaOH gelöst in ca. 650ml ddH<sub>2</sub>O, ad 1000ml ddH<sub>2</sub>O und filtrieren) und 3x MOPS-Ladepuffer für die TGGE: (6ml 50x ME-Puffer, 50mg Bromphenolblau , 50mg Xylencyanol , ad 100ml ddH<sub>2</sub>O)

Eine 8%-Polyacrylamid/MOPS-Gel Stammlösung (21,6g Harnstoff, 12ml Gel 30® [Acrylamid : Bisacrylamid = 30:0,8], 0,9ml 50x ME-Puffer, 2,25ml 40%iges Glycerin, ad 45ml ddH<sub>2</sub>O, Gesamtvolumen 45ml) wird mit 120µl APS (Ammoniumperoxidsulfat 10%) und 70µl TEMED (Tetramethyldiamin) vermischt und zwischen zwei Glasplatten gegossen. Der hintern Glasplatte liegt eine Gelträgerfolie dicht auf, deren wasserabweisende Seite zur Mitte hin gerichtet ist. Beim Aufbau der Glasplatten wird etwa 1ml 0,1% Triton X-100 zwischen die hintere Glasplatte und die Trägerfolie gespritzt, um einen gleichmäßigen Kontakt und damit eine gleichmäßige

Hitzeübertragung zu gewährleisten. Die Pufferkammern werden mit 1,2x ME-Puffer gefüllt. Nach Erstarren des Gels wird das an der Trägerfolie klebende Gel auf die Heizplatte des TGGE-Gerätes gelegt, wobei ca. 1ml 0,1% Triton X-100 zur Gewährleistung eines engen Kontaktes zwischen Heizplatte und Folie verwendet wird. Die zu analysierenden PCR-Produkte werden 5 Minuten UV-Licht (365nm) exponiert, damit es zu einer Psoralen-Quervernetzung kommt. 4µl des vorbereiteten PCR-Produktes werden mit 2,5µl 3x MOPS Ladepuffer gemischt und davon 6µl sofort auf das horizontale Gel aufgetragen. Die Elektrophorese wird zunächst für 15 Minuten bei 10°C und 300V durchgeführt, damit die Proben in das Gel einwandern. Danach wird mittels zwei Thermokyrostaten ein Temperaturgradient aufgebaut, der in der Regel 30°C-60°C beträgt, um dann mit 400V die Elektrophorese durchzuführen.

#### **3.2.8. Silberfärbung**

Zur Fixierung der DNS wird das Gel als erstes in 1%iger Salpetersäure (15,4ml 65% Salpetersäure ad 1000ml ddH<sub>2</sub>O) vorsichtig von der Trägerfolie gelöst und 15 Minuten lang auf einem Schüttler bewegt. Nach kurzem Waschen in ddH<sub>2</sub>O wird das Gel 25 Minuten zum Färben der DNS in 0,2% Silbernitratlösung (0,2% AgNO<sub>3</sub>: 1g Silbernitrat ad 500ml ddH<sub>2</sub>O) bewegt. Danach wird das Gel wieder kurz mit ddH<sub>2</sub>O gewaschen und dann solange in 0,28M Natriumcarbonat Lösung (29,7g Natriumcarbonat ad 1000ml ddH<sub>2</sub>O), der unmittelbar vor Gebrauch 300µl 37%iges Formaldehyd zugesetzt werden, entwickelt, bis die DNS sichtbar wird. Um die Entwicklung zu stoppen, wird das Gel 10 Minuten in 10% Essigsäure bewegt. Nach erneutem Waschen in ddH<sub>2</sub>O muss das Gel auf Blottingpapier überführt und bei 80°C im Vakuumtrockner für ca. eine Stunde getrocknet werden.

#### **3.2.9. Sequenzierung**

Zur Ermittlung der Nukleotidsequenz der DNS wurde die Dideoxy-Kettenterminations-Methode nach Sanger (1977) verwendet. Sie macht von der Möglichkeit Gebrauch, mit Hilfe der DNS-Polymerase an Einzelstrang-DNS von einem Primer aus einen neuen komplementären DNS-Strang zu synthetisieren. Die Synthese erfolgt in Gegenwart von Nukleotidtriphosphaten, denen in niedriger Konzentration Didesoxynukleotide (ddNTPs), d.h. Nukleotide, deren 3'-Hydroxylgruppen an der Desoxyribose fehlen, beigefügt sind. Es kommt unter diesen Bedingungen zum Abbruch der DNS-Synthese, sobald ein ddNTP in den neu synthetisierten Strang eingebaut wird, da wegen der

fehlenden 3'-OH-Gruppe der Desoxyribose kein weiteres Nukleotid angefügt werden kann. Proben, die in der TGGE ein auffälliges Bandenmuster zeigten, wurden einer DNS-Sequenzierung unterzogen. Hierzu musste als erstes einzelsträngige DNS hergestellt werden. Dazu werden 10µl Dynabeads® (M-280 Streptavidin, 10µg/µl) in ein 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß gegeben, mit einem Magneten separiert und der Überstand abgenommen. Die Dynabeads® werden zunächst in 10µl des 2xBW (Bindungs/Wasch)-Puffers (10mM Tris-HCl pH 7,5, 1mM EDTA, 2,9M NaCl, TE-Puffer: 0,1M Tris-HCl pH 8,0, 1mM EDTA, 0,15M NaOH) resuspendiert, separiert und der Überstand abgenommen, dann werden sie in 20µl 2xBW-Puffer resuspendiert. Anschließend werden 20µl PCR-Amplifikat zugegeben und gut vermischt. Damit es zu einer DNS-Bindung an die Beads kommt, wird die Lösung 20 Minuten bei RT sanft geschüttelt (Vortex-Gerät, Stufe 1,5), wobei die Beads stets suspendiert bleiben sollten. Nach erneuter Durchmischung wird die Lösung im Magneten separiert und der Überstand abgenommen. Resuspendieren der Dynabeads® in 20µl 2x BW-Puffer, separieren und den Überstand abnehmen. Danach werden die Dynabeads® in 8µl 0,15M NaOH resuspendiert. Um die DNS-Stränge zu trennen wird die Lösung 10 Minuten bei RT sanft geschüttelt (Vortex-Gerät, Stufe 1,5), im Magneten separiert und der Überstand abgenommen. Resuspendieren der Dynabeads® erst in 25µl 0,15M NaOH, dann in 20µl BW-Puffer und schließlich in 25µl TE-Puffer. Nach abschließender Separation und Abgießen des Überstandes werden die Dynabeads® (=Einzelstrang-DNS) in 7µl ddH<sub>2</sub>O gelöst.

#### **3.2.9.1. Radioaktive Einzelstrang-DNS-Sequenzierung**

Protokoll nach T7 Sequenase Version 2.0 7-deaza-dGTP DNS-Sequenzierungs-Kit von der Firma Amersham. Bei Erhalt des Kits wird die T7 Sequenase verdünnt, so dass eine Endkonzentration von 1,6U/µl, bei einem Endvolumen von 200µl entsteht. Das Enzym wird bei -20°C gelagert.

Zur Gelzubereitung werden 50ml Gel Master-Prämix Lösung: (Gel30® (Acrylamid:Bisacrylamid = 30%: 0,8%) 190ml, Harnstoff (7M) 420g, 20x glycerintoleranter Sequenzgelpuffer 50ml, ddH<sub>2</sub>O ad1000ml) mit 400µl 10%iges APS (Ammoniumpersulfat) und 20µl TEMED (Tetramethyldiamin) gemischt. Die fertige Gelmischung wird zwischen zwei Glasplatten, die vorher sehr gut mit Isopropanol gereinigt und mit dem Antihafspray Acrylease® vorbehandelt wurden, gegossen. Die

Polymerisationszeit beträgt ca. 2 Stunden. Für die Annealing-Reaktion werden 7 µl Einzelstrang-DNS, 2 µl T7 Sequenase Reaktionspuffer und 1 µl Sequenzier-Primer (1:10 verdünnt) in ein 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß pipetiert. Dieser Annealing-Mix wird für 2 Minuten im 65°C-Wasserbad inkubiert, dann über 30 Minuten bei RT abgekühlt und bis zur Benutzung auf Eis gestellt. Zusätzlich wird für die Vorbereitung der Markierungs- und Terminationsreaktion folgendes auf Eis bereitgestellt:

5x Markierungsmix (7-deaza-dGTP): (80 µM 7-deaza-dGTP, 80 µM dCTP, 80 µM dTTP; entsprechende Menge 1:5 verdünnen), 4 verschiedene Terminationsmixes: ( 80 µM 7-deaza-dGTP-dNTP-Gemische: mit je 8 µM ddATP/-ddCTP/-ddGTP/-ddTTP und 50mM NaCl), 0,1M DTT (Dithiothreitol), Mn-Puffer (enthält 0,1m MnCl<sub>2</sub>), <sup>35</sup>S-dATP, verdünnte T7 Sequenase (1,6U/µl), Stopp-Lösung. Pro Sequenzreaktion werden 4 0,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße beschriftet und in jedes 2,5 µl des entsprechenden Terminationsmixes gegeben und bei 37°C vorgewärmt. Für die Markierungsreaktion wird der Annealing-Mix vom Eis genommen und folgendes wird in ein Reaktionsgefäß pipetiert: (Annealing-Mix 10 µl, 0,1M DTT 1 µl, verdünnter Markierungsmix (1:5) 2 µl, Mn-Puffer 1 µl, <sup>35</sup>S-dATP 0,5 µl, T7-Polymerase (1,6U/µl) 2 µl). Das Gesamtvolumen von 16,5 µl durch Auf- und Abpipetieren vorsichtig mischen. Dieser Markierungs-Reaktionsansatz wird 5 Minuten bei RT inkubiert. Für die Terminations-Reaktion werden je 3,5 µl des Markierungs-Reaktionsansatzes zu den vorgewärmten Terminations-Mix Ansätzen gegeben, gut gemischt und bei 37°C inkubiert. Nach 5 Minuten werden je 4 µl Stopp-Lösung zugegeben, gut gemischt und auf Eis gestellt. Es werden für den Gellauf 800ml 1x Glycerintoleranter-Puffer vorbereitet, indem 40ml eines 20x Puffers mit 760ml ddH<sub>2</sub>O verdünnt werden. Der 1x Glycerintoleranter-Puffer wird in die obere und untere Pufferkammer eingefüllt. Der Spannungsgeber wird bei einem Gel auf konstante 50W, bei zwei Gelen auf konstante 90W eingestellt. Die optimale Voltzahl liegt dann bei über 1700V. Je 4,5 µl Probe werden auf eine Falcon-Multiwell-Platte pipettiert und zur Trennung der DNS-Einzelstränge 2 Minuten bei 80°C erhitzt. Danach werden 3 µl der Probe auf das Gel aufgetragen und der Lauf gestartet. Nach dem Lauf wird das Gel auf Blottingpapier ca. eine Stunde bei 80°C im Vakuumtrockner getrocknet und dann zusammen mit einem Film in eine Kassette eingelegt. Die Exposition sollte ca. 24 Stunden betragen, danach wird der Film entwickelt.

### **3.2.9.2. Automatisierte Sequenzierung**

Ein Teil der Patientenproben wurden zur Zeitersparnis einer automatisierten Zyklussequenzierung auf dem ABI Prism 310® (Automatischer DNS Sequenzierer), einem Kapillar-Sequenziergerät durchgeführt. Dieses Gerät erkennt mit Hilfe eines Lasers die markierten Sequenzen und ordnet jeder Länge eine Base zu. Entsprechend der Folge der Signale der vier Farbstoffe konnte am Ende der Analyse aus dem sich ergebenden Bild auf die Originalsequenz gefolgert werden. Die Auswertung der Sequenzen erfolgte mit einer ABI-Software entsprechend der Angaben des Herstellers.

### **3.2.10. Restriktionsenzyme**

Bei einigen Patienten konnte das Sequenzierungsergebnis mit Hilfe von Restriktionsenzymen bestätigt werden.

### **3.2.11. Allelspezifische PCR zum Nachweis von Mutationen**

Zum Nachweis eines Basenaustausches wurde eine PCR mit einem Primer durchgeführt, dessen Sequenz die veränderte Base am 3`-Ende enthielt. Dieser Primer lagerte sich nicht der Wildtypsequenz an und bildete kein PCR-Produkt. Zur Kontrolle wurde ein zweites Primerpaar zum Ansatz gegeben, das eine bekannte Sequenz amplifizierte. Bei der Auswertung in einer Agarosegel-Elektrophorese zeigten sich bei Individuen, die den Basenaustausch in ihrer DNS-Sequenz hatten, zwei Banden, während bei Gesunden nur die Kontrollbande sichtbar wurde.

## 4. Ergebnisse

### 4.1. Klinische Daten

#### 4.1.1. Das Patientenkollektiv

Zur gesamten Screeninggruppe gehörten insgesamt 126 nicht miteinander verwandte Patienten, aus deren EDTA-Blut oder Gewebeproben genomische DNS gewonnen wurde:

- 63 Patienten gehörten zur Gruppe B, darunter Patienten aus der Berliner Charité und dem gesamten Bundesgebiet
- 63 Patienten gehörten zur Gruppe D, die aus Patienten der National Eye Clinic in Hellerup, Dänemark bestand.

Phänotyp	Anzahl der Patienten
Klassisches Marfan Syndrom	75
Fragliches Marfan Syndrom (Symptome des MFS, Genter Kriterien werden nicht erfüllt)	32
Atypisch schweres Marfan Syndrom	2 (B15, D60)
Neonatales Marfan Syndrom	1 (B12)
Isoliertes Aneurysma der Aorta ascendens	4 (B2, B24, B57, B60)
Primäre Dissektion der Aorta descendens, die Genter Kriterien werden aber nicht erfüllt	1 (B55)
Shprintzen-Goldberg-Syndrom	2 (B44, B58)
Hochwuchs, Skoliose	1 (B73)
Ektopia lentis, skelettale Manifestationen, keine Aortendilatation	5 (D10, D37, D46, D62, D67)
Isolierte Ektopia lentis,	3 (D55, D68, D69)

*Tabelle 4.1.: Verteilung der Phänotypen bei den 126 Patienten der Studie*

Eine Gruppe von 75 Patienten erfüllte in Hinblick auf die Genter Nosologie (DePaepe 1996) die Kriterien des „klassischen“ MFS. Ein Patient (B12) hatte ein neonatales MFS (Booms 1999). Zwei Patienten (B15 & D60) wurden wegen eines besonders stark ausgeprägten Phänotyps in die Kategorie atypisch schweres MFS eingeordnet (Tiecke 2001). Bei 32 weiteren Patienten konnten marfantypische Manifestationen gefunden werden, jedoch wurden die Kriterien der Genter Nosologie nicht ausreichend erfüllt. Zusätzlich gab es noch eine Gruppe von 16 Patienten mit einem breiten Spektrum an anderen Erkrankungen. Die Krankengeschichten einiger Patienten mit ungewöhnlichen Charakteristika werden im Folgenden kurz wiedergegeben.

## 4.1.2. Klinische Details der Patienten

### 4.1.2.1. D55: Exon 2 (c.184C>T, p.R62C)

31jähriger männlicher Patient ohne Familienanamnese für das MFS und beidseitiger Ektopia lentis. Im Alter von 14 Jahren erfolgte eine Exstriktion der rechten Linse. Bei komplizierender Netzhautablösung und Phthisis war die Enukektion des Auges notwendig. Mit 30 Jahren musste die linke Linse, diesmal komplikationslos, entfernt werden. Der Aortendurchmesser lag mit 31mm im Normbereich. Seine Körpergröße lag bei 181cm, es zeigten sich keine weiteren Auffälligkeiten des Skelettsystems. Insgesamt konnten die Kriterien der Genter Nosologie für ein klassisches MFS nicht erfüllt werden.

### 4.1.2.2. D10: Exon 3 (c.344C>G, p.S115C)

16jährige Patientin ohne Familienanamnese für das MFS, mit bereits bei Geburt diagnostizierter beidseitiger Ektopia lentis und im weiteren Verlauf aufgetretener, totaler Luxation beider Linsen. Zusätzlich zeigten sich flache Korneae, eine axiale Bulbuslänge von 24,4 cm und eine beidseitige hypoplastische Iris. Echokardiographisch fielen keine Pathologien auf. Bei einer Körperlänge von 175cm, waren die Körperproportionen unauffällig. Skoliose, Deformitäten des Thorax oder eine Arachnodaktylie lagen nicht vor. Es zeigte sich jedoch eine reduzierte Extension der Ellbogen, der Schädel war dolichocephal und ein hoher gotischer Gaumen, sowie ein Enophthalmus konnten festgestellt werden. In Hinsicht auf die Genter Nosologie wurde mit der Beteiligung des okulären Systems ein Hauptkriterium erfüllt und es zeigte sich eine Beteiligung des Skelettsystems, bei echokardiographisch unauffälligem Befund.

### 4.1.2.3. B60: Exon 21 (c.2581C>T, p.R861X)

47jähriger Patient ebenfalls ohne auffällige Familienanamnese. Im Alter von 43 Jahren kam es zu einer Dissektion der Aorta ascendens mit anteriorem Spinalarteriensyndrom (spinaler Schock) und operativer Rekonstruktion der Aorta. Postoperativ fand sich eine Dissektionsmembran vom Aortenbogen bis in die Aorta thoracica. Die Aorta descendens hatte einen Durchmesser von 50mm. Es zeigten sich keine skelettalen Manifestationen, die ein Hauptkriterium erfüllte hätten, die Körperlänge betrug 180cm (ca. bei 50. Perzentile) und es fiel ein dolichocephaler Schädel und Pes planus auf,

zudem wurde von häufigen Verletzungen der Bänder berichtet. Es lag keine Ektopia lentis vor. Die Kriterien zur Diagnose eines MFS waren somit nicht erfüllt.

#### **4.1.2.4. B15: Exon 24 (c.3037G>A, p.G1013R)**

Bei der Patientin B15 wurde die Diagnose des im Alter von 8 Monaten aufgrund von Arachnodaktylie, Kyphoskoliose, Pectus excavatum, schwerer Myopie, Anorexie, Pergamenthaut und kardiovaskulären Symptomen gestellt. Seit der frühen Kindheit war die Patientin mit Gewichtsverläufen unterhalb der 3. Perzentile und einer Körperlänge oberhalb der 97. Perzentile sehr dünn. Die schnelle Progression der Skoliose nach dem 6. Lebensjahr erforderte zwei Skoliose-Operationen im 8. und 10. Lebensjahr. Zudem war auch eine schwere, progressive Myopie zu beobachten und im Alter von 12 Jahren kam es zu einer kompletten Luxation beider Linsen in den Glaskörper. Mit 16 Jahren wurde ein Aneurysma des Bulbus aortae von 75mm gemessen und zusätzlich lag eine Mitralinsuffizienz II° vor. Daraufhin wurde die Patientin mit einem klappentragenden Conduit versorgt. Ein Woche nach der Operation kam es plötzlich zu einer Nahtdehiszenz und die Patientin verstarb an inneren Blutungen. Die Eltern und zwei Geschwister sind gesund und zeigen keine Zeichen einer Bindegewebsstörung.

#### **4.1.2.5. D60: Exon 24 (c.3037G>A, p.G1013R)**

Die 8jährige Patientin erhielt im Alter von 3 Jahren einen Aorten- und Mitralklappenersatz mit Aorta ascendens Ersatz. Eine beidseitige Ektopia lentis wurde im ersten Lebensjahr diagnostiziert und eine Ektomie der Linsen folgte im 6.Lebensjahr. Die Eltern und der ältere Bruder sind klinisch unauffällig.

#### **4.1.2.6. B27: Exon 27 (c.3344A>G, p.D1115G)**

35jährige Patientin mit Erstdiagnose des MFS im Alter von 13 Jahren. Im Erwachsenenalter betrug die Körperlänge 168cm. Auffällig waren eine thorakale Skoliose, ein Pectus carinatum, ein schmaler Gesichtsschädel mit Fehlstellung der Zähne und eine Arachnodaktylie mit einer ulnaren Deviation der Finger der rechten Hand. Die MRT zeigte eine sakrale Duraektasie und auf Höhe von L5/S1 einen Prolaps des Discus intervertebralis. Echokardiographisch konnte ein Mitralklappenprolaps mit leichter Regurgitation, ein persistierendes Foramen ovale (PFO) und eine leichte Dilatation der Aortenwurzel (40 mm) festgestellt werden. Im Alter von 34 Jahren wurde ein Aneurysma im Septum interventriculare diagnostiziert, das vorher nicht auffällig

geworden war, zu dem Zeitpunkt aber zu einer progressiven kardialen Dekompensation führte. Aneurysma und Aortenwurzel wurden chirurgisch versorgt.

#### **4.1.2.7. D30: Exon 50 (c.6231-6232insT)**

32jähriger Patient, mit grenzwertiger Arachnodaktylie (Murdoch positiv, Steinberg negativ), Pectus carinatum, Überstreckbarkeit der Gelenke, Pes planus, Striae atrophicae und einer Körperlänge von 203 cm (10cm über der 97. Perzentile), jedoch keine Skoliose. Mit 4 Jahren wurde eine Leistenhernie operativ korrigiert, mit 25 Jahren diagnostizierte man eine Ektopia lentis, mit Myopie und Iris Translumination. Es zeigten sich keine kardiovaskulären Auffälligkeiten. Bei Mutter und Bruder sind ebenfalls ein MFS bekannt, es gab jedoch keine genaueren Informationen.

#### **4.1.2.8. D67: Exon 54 (c.6661T>G, p.C2221G)**

24jährige Patientin ohne Familienanamnese für das MFS. Es lagen Arachnodaktylie, Skoliose, Überstreckbarkeit der Gelenke, Pectus excavatum, Pes planus und ein hoher gotischer Gaumen, sowie Striae atrophicae vor. Die Körperlänge betrug 186cm (75. bis 90. Perzentile). Mit 18 Jahren wurde eine Ektopia lentis diagnostiziert. Außerdem zeigte die Patientin eine milde Myopie (-2,5dpt), eine Translumination der Iris und eine persistierende Pupillenmembran. Die axiale Bulbuslänge war mit 23,6mm normal und auch die Oberfläche der beiden Korneae war unauffällig. Echokardiographisch fiel ein Mitralklappenprolaps auf. Der Aortendurchmesser war jedoch unauffällig.

#### **4.1.2.9. D21: Exon 57 (c.7016G>A, p.C2339Y)**

49jähriger Patient, ebenfalls ohne Anhalt für MFS in der Familie. Bereits in der frühen Kindheit dislozierte die Linse des linken Auges und musste im Alter von 18 Jahren bei Amblyopie entfernt werden. Im rechten Auge hatte sich zusätzlich eine Katarakt entwickelt und beide Korneae wurden als flach beschrieben. Mit 10 Jahren wurde eine Leistenhernie operativ revidiert. Zum Zeitpunkt der letzten Untersuchung war der Patient 190cm groß (95. Perzentile) und zeigte bis auf eine Arachnodaktylie keine weiteren skelettalen Auffälligkeiten. Das kardiovaskuläre System war unauffällig. Alle drei Söhne des Patienten sind ebenfalls klinisch auffällig.

Exon	Patient	Gent <sup>a</sup>	Alter	Geschlecht	Skelett <sup>b</sup>	Auge <sup>c</sup>	Kardiovaskulär <sup>d</sup>	Andere <sup>e</sup>	Familie <sup>f</sup>	Kosegre. <sup>g</sup>
2	D15	j	25	M	1,4,8,15	EL	DBA (46)	St	+	kA
2	D55	n	31	M	-	EL,AR	n	*	-	+
2	B46	v	12	M	n/a	n/a	kA	-	-	kA
3	D10	n	16	F	7,14,15	EL	n	*	-	+
14	B3	e	15	F	1,4,6	EL,M	DBA (32mm: +/-)	-	-	+
14	B1	j	8	M	4,5,7,8,12,14,15	EL,M	DBA (34mm), MKP	*	+	+
15	D26	j	50	F	8	FC	Dis	St	+	+
16	B9	j	12	M	1,4,8,10	EL	DBA (32mm)	-	+	kA
16	B19	j	3	M	4,5,6,11,12,	EL	DBA	-	-	kA
16	D59	e	16	F	1,4,6,11,12,	EL,M	kA	-	-	+
16	D62	n	49	F	4,6,8,10,11	EL,M	MKP	St	-	kA
16	D31	j	13	M	1,4,6,8,11,	EL,M	kA	St	+	+
18	D2	j	11	F	1,4,5,13,14	EL,M	DBA (+/-)	-	+	+
18	D40	j	24	F	1,3,4,6,10	EL,M	DBA (+/-), MKP	-	+	+
18	B18	j	8	F	4,8,11,12	EL,M	DBA, MKP	-	-	+
18	B65	j	18	M	1,2,4,5,6,8, 11,12,14	EL	DBA (60-70)	-	-	+
19	B51	j	17	M	1,4,5,7,12, 14,	EL,M	DBA (38), MKP	H,*	+	kA
19	D37	j	19	M	1,4,10,11,15	EL,M	-	H	+	+
21	B60	j	43	M	8,14	-	Dis	*	-	kA
22	D7	j	43	M	4	EL	kA	-	+	kA
23	B62	j	28	M	1,4,6,10,11	EL	DBA (70), MKP	St	-	kA
24	B15	j	16	F	3,4,6,12,14	EL,M	DBA (75) ,MKP	*	-	kA
24	B47	j	3	F	8,11,12,	n/a	kA	-	+	kA
24	D54	j	35	M	1,3,4,6	EL	DBA	St	-	kA
24	D60	j	8	F	2,4,8,11,12,14,15	EL,M	DBA,MKP	*	-	+
27	B53	n	7	F	10,12,14,		DBA (+/-)	-	+	kA
27	B27	j	36	F	2,6,12,	M	DBA (42)	DE	+	kA

30	B35	j	10	F	1,2,4,5,6,8, 11,13,14	M	DBA (28) MKP		+	kA
31	B12	j	4/12	M	4,7,13		DBA,MKP	nMFS	-	
31	D1	j	51	M	1,11,12,14,	EL	MKP, DBA (45)		+	kA
32	B7	j	13	F	1,2,4,12,	M	DBA (38), MKP	-	+	+
34	D36	j	11	F	1,4,8,11,	EL	DBA ,MKP	-	+	+
34	D13	j	28	F	6,8,11	EL	DBA (48), MKP		+	+
37	D27	j	35	M	1,2,5,14	EL,M	Dis	St,Pneu	+	kA
40	B22	j	30	M	1,2,4,5,6,12,14,	EL,M	DBA (44) Mit 32 Jahren (50)	-	+1°rel	+
43	B43	j	43	M	1, 4, 5, 6, 8, 10, 11, 12,	EL, M	DBA	-	-	kA
43	D5	j	29	M	1,4, 6, 12, 14,	EL,M	DBA (47)	Colob.	+	kA
44	D19	j	21	F	1,4	EL,M	DBA	-	+	+
47	B52	j	19	F	4,6,11,12,13,14	M	MKP, MI II°	-	+	+
48	D16	j	3	F	1,4,8,10,11,12,14, 15	EL,M	DBA	-	+	kA
50	B79	e	13	M	2,5	-	kA	-	-	kA
50	D30	j	32	M	1,2,4,8,11	EL,M	n	H,St	+	+
54	B37	v	42	F	n/a	n/a	Dis	-	-	kA
54	D67	j	24	F	1,4, 6,10,11, 12	EL,M	MKP	-	-	kA
55	B45	j	9	F	1,4	-	DBA	H	+	kA
57	D63	e	16	F	1,4,6,8,11	EL,M	n	St	-	kA
57	D21	n	49	M	1,4	EL,FC	n	H	+	+

Tabelle 4.2: Übersicht der klinischen Manifestationen aller Patienten der Studie

Tabelle 4.2.: Übersicht der klinischen Manifestationen aller Patienten der Studie

<sup>a</sup> j: Patient erfüllt die Kriterien der Genter Nosologie für das Marfan-Syndrom (DePaepe, 1996), n: die Kriterien der Genter Nosologie werden nicht erfüllt, e: „entwickeln“ wurde für Kinder und Heranwachsende verwendet, die zum Zeitpunkt der Untersuchung die Kriterien der Genter Nosologie noch nicht erfüllten, bei denen aber die Vordiagnose des MFS vor dem Hintergrund, der sich erst entwickelnden Symptome gemacht werden konnte, v: „vermuten“ wurde verwandt bei Patienten bei denen aufgrund von Informationsmangel die Genter Kriterien nicht erfüllt wurden, aber aufgrund der vorliegenden Daten ein MFS vermutet wurde.

<sup>b</sup> 1, Körpergröße > 95Percentile; 2, Pectus carinatum; 3, Pectus excavatum (operationsbedürftig); 4, Arachnodaktylie; 5, Quotient von oberer/unterer Körperhälfte <0,86 oder Armspanne/Körpergröße > 1,05; 6, Skoliose > 20°; 7, Ellenbogenstreckdefizit (<170°); 8, Pes planus; 9, Protrusio acetabuli; 10, moderates Pectus excavatum; 11, überbewegliche Gelenke; 12, hoher (gotischer) Gaumen mit Zahnfehlstellung durch beengte Raumverhältnisse; 13, typische faciale Erscheinung 14, Dolichocephalie; 15, Enophthalmus

<sup>c</sup> EL, Ektopia lentis; M, Myopie; FC, flache Cornea; AR, Ablatio retinae

<sup>d</sup> DBA, Dilatation Bulbus aortae (mm); Dis, Dissektion; MKP, Mitralklappenprolaps, MI, Mitralklappeninsuffizienz; n, keine kardiovaskulären Auffälligkeiten; +/- steht für ein grenzwertig pathologisches Symptom, kA, keine Angaben

<sup>e</sup> St, Striae atrophicae; Pneu, Pneumothorax; DE, Duralektasie; H, Hernien, Colob., Linsenkolobom; \* steht für besondere Merkmale die im Text näher erklärt werden

<sup>f</sup> + und – steht für Vorhandensein oder Abwesenheit eines Verwandten 1° der die Kriterien für das MFS nach der Genter Nosologie erfüllt

<sup>g</sup> Kosegregation dieser Mutation mit dem Marfan-Phänotyp in der Familie, kA, keine Angaben.

## 4.2. Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

### 4.2.1. Optimierung der PCR-Ansätze

Um eine PCR, wie sie in 2.2.5 beschrieben wurde, erfolgreich durchführen zu können, mussten die Bedingungen für jedes Exon optimiert werden. Dabei war es zum einen wichtig, die Konzentration der verwendeten Reagenzien genau abzustimmen, zum anderen mussten aber auch die Temperaturen und Zeiten der einzelnen Zyklusschritte bestmöglich gewählt werden. Als erstes wurde die optimale Konzentration der Reagenzien empirisch ermittelt. Es wurde dabei folgendes Thermoprofil gewählt: 30s bei 95°C, 30s bei  $T_a$ , 30s bei 72°C, wobei  $T_a$  der vom Programm „Oligo“ errechnete Annealing-Temperatur für den jeweiligen Primer entsprach. Besonders ausschlaggebend war die Bestimmung der Magnesiumkonzentration, die zwischen 0,5mM und 3,0mM variiert wurde. In den meisten Fällen konnte eine Konzentration von 1,5mM verwendet werden, einige Exone benötigten jedoch eine höhere Konzentration, die aus Tabelle 4.3 entnommen werden kann. Die übrigen Reagenzien konnten für jedes Exon in folgender Konzentration bestätigt werden: dNTP 200µM, DNS 200µg, Taq-DNS-Polymerase 5U/µl, 10xTaq-DNS-Polymerase-Puffer und je Primer (Hin und Rück) 0,5µM. Es wurde immer eine Negativkontrolle mit ddH<sub>2</sub>O anstatt DNS mitgeführt, um eine Kontamination der Reagenzien auszuschließen.

Als nächstes wurden die optimale Annealing-Temperatur ( $T_a$ ) und andere Parameter des Thermoprofils ermittelt. Grundsätzlich sollte versucht werden, die höchste Annealing-Temperatur zu finden, bei der noch eine ausreichend starke und verlässliche Amplifikation möglich ist, unspezifische Banden aber unterdrückt werden. Zu diesem Zweck wurde eine PCR mit einem Temperaturgradienten während der Annealing-Phase durchgeführt. Die Temperaturen dieses Gradienten wurden so gewählt, dass sie die jeweils computerermittelten Annealing-Temperaturen der Primerpaare einschlossen. Über den Temperaturgradienten wurden identische Proben verteilt, und die Probe mit dem besten Resultat ergab die  $T_a$  für das entsprechende Exon, die ebenfalls in Tabelle 4.3 wiedergegeben sind.

Nach der Optimierung der PCR wurden die DNS-Proben aller Patienten amplifiziert und die Größe der Amplifikate anhand des Längenstandards PhiX174DNA/Hae III kontrolliert, die in allen Fällen mit der erwarteten Größe übereinstimmte.

### 4.2.2. Primer-Auswahl

Die Primerpaare wurden grundsätzlich so ausgewählt, dass die resultierenden Amplifikate sowohl das zu analysierende Exon, als auch die angrenzenden intronischen 5'- und 3'-Spleiß-Consensus-Sequenzen umfassten. Als Grundlage für die Sequenzen und Nummerierungen dieser Bereiche wurde die Arbeit von Pereira et al. (1993) verwendet. Die angestrebte Primerlänge lag um die 20bp und die Schmelztemperatur sollte optimalerweise zwischen 50-55°C liegen. Optimiert wurde die Primer-Auswahl mit Hilfe des Computerprogramms Oligo 4.0 (Software zur Primeranalyse, Copyright 1989-91 bei Wojciech Rychek), indem die Primer in Bezug auf unerwünschte Dimer- und Haarnadelbildung, falsche Anlagerung innerhalb des Amplifikates und die Kompatibilität untereinander (ähnliche Anlagerungstemperaturen, keine ausgedehnte Komplementarität zwischen den beiden Primern) untersucht wurden. Alle potentiellen Amplifikate wurden danach mit dem Programmpaket Melt87/SQHTX (Lerman und Silverstein 1987) auf ihre Tauglichkeit in der TGGE untersucht. Bei jedem Primerpaar wurde ein Primer am 5'Ende mit Psoralen modifiziert. Psoralen ist eine photoaktive organische Verbindung, die direkt nach der Oligonukleidsynthese an den 5'-Terminus eines Primers angefügt wird. Nach erfolgter PCR kommt es durch Bestrahlung mit mittelwelligem UV-Licht (365nm Wellenlänge) zu kovalenten Bindungen zwischen den beiden Einzelsträngen, was auch als „*cross-linking*“ bezeichnet wird. Da Psoralen

kovalent an Thymidin-Basen des Gegenstranges bindet, ist es notwendig, dass sich am 5' Ende des zu modifizierenden Primers zwei Adenin-Reste befinden (Costes 1993). Waren diese in der Sequenz nicht enthalten, wurden sie zusätzlich hinzugefügt, was in Tabelle 4.3 durch die Setzung von Klammern verdeutlicht wird. Alternativ zu Psoralen kann auch eine GC-Klammer verwendet werden. Es handelt sich dabei um eine Sequenz, die an den 5'-Terminus des ausgewählten PCR-Primer angefügt wird und fast nur aus G (Guanin) oder C (Cytosin) Nukleotiden besteht. Während der PCR wird diese Sequenz ebenfalls mit amplifiziert und das resultierende PCR-Produkt besteht dann aus der zu analysierenden Sequenz und einer doppelsträngigen GC-reichen Region an einem der beiden Enden des Amplifikates. Durch den hohen GC-Gehalt erhöht sich der  $T_m$ -Wert im Bereich der Klammer im Vergleich zur analysierenden Sequenz deutlich. Das Schmelzverhalten des restlichen Amplifikates wird in der Regel auch durch das Einfügen der Klammer verändert. Bei geschickter Primerwahl liegt die gesamte, zu analysierende Sequenz in einer einzigen Schmelzdomäne. Da Psoralen-Klammern kostengünstiger sind und zusätzlich die Durchführung von Multiplex-PCR/TGGE-Analysen erleichtern, wurden sie in dieser Studie bevorzugt verwendet. Welcher der Primer eines Paares (sense oder antisense) modifiziert wurde, hing vom jeweiligen Schmelzprofil des Amplifikates ab, das vom Programm Melt87 graphisch dargestellt wurde. Dieses Schmelzprofil zeigt die unter Psoralenklammerung zu erwartende Aufschmelzung der einzelnen Basenpaare über den Temperaturgradienten hinweg mit idealer Aufschmelzung aller Basenpaare bei einer Temperatur. Bei einigen Exonen berechnete das Programm relativ schlechte Schmelzeigenschaften, in diesen Fällen wurden beide Primer eines Paares mit Psoralen modifiziert, da so die Schmelzeigenschaften der Fragmente deutlich verbessert werden können, die sonst nicht für die TGGE-Analyse geeignet wären (Gille 1998).

Mit dem Displacement-Profil eines jeweiligen Amplifikates zeigte das Programm die zu erwartenden Laufabstände der Heteroduplices von nicht mutierten Homoduplices in einem simulierten TGGE-Lauf, wenn man an jeder Position der Sequenz nacheinander eine Punktmutation zuließ. Nur wenn im Falle einer Punktmutation an jeder beliebigen Position der Amplifikat-Sequenz auch eine ausreichende Trennung im Gel zu erwarten war, wurden die Primer für das jeweilige Amplifikat ausgewählt.

### 4.3. Temperatur-Gradienten-Gel-Elektrophorese (TGGE)

#### 4.3.1. Perpendikuläre TGGE zur Optimierung des Temperaturgradienten

Um die tatsächliche Schmelztemperatur des psoralen-modifizierten PCR-Amplifikates zu bestimmen, muss eine perpendikuläre TGGE-Analyse durchgeführt werden. Dabei erfolgt die Elektrophorese senkrecht zum Temperaturgradienten (30-60°C). 120µl PCR-Amplifikat werden mit 60µl 3x MOPS Ladepuffer versetzt und in eine längliche Proben tasche hinein pipetiert. Nach einem ca. 2h Lauf im Gel entsteht eine Sigmoidkurve, da Amplifikate in Bereichen des Gels, in denen die Temperatur unterhalb ihres Schmelzpunktes liegt, relativ schnell wandern, während sie in Bereichen des Gels, in denen Temperaturen oberhalb ihres Schmelzpunktes herrschen, nur sehr langsam vorankommen. Diese verlangsamte elektrophoretische Geschwindigkeit erklärt sich aus den teilweise aufgeschmolzenen, komplexen Konformationen der Moleküle. Am Umschlagpunkt der Kurve sind 50% der Amplifikate geschmolzen, dieser Punkt gibt die Schmelztemperatur des Amplifikates an (Pfeil in Abb. 3.1.). Man kann eine allmählich steigende elektrophoretische Geschwindigkeit von links nach rechts erkennen, da die Amplifikate unabhängig vom Schmelzzustand umso schneller laufen, je höher die Temperatur des Gels ist. Oft sieht man in den heißesten Bereichen des Gels wieder eine Fraktion die schneller läuft, hier sind die Amplifikate vollständig aufgeschmolzen und laufen als Einzelstränge.

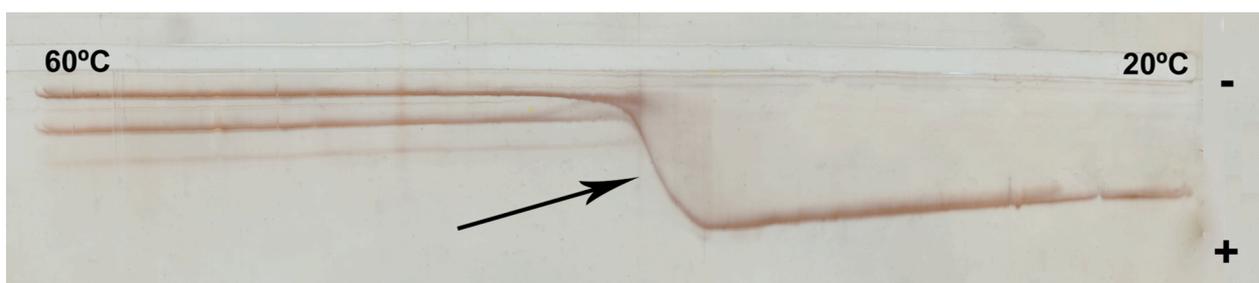


Abbildung 4.1.: Perpendikuläre TGGE-Analyse

#### 4.3.2. „Travelschedule-TGGE“ zur Optimierung der Laufzeiten

Hierbei handelt es sich um eine parallele TGGE, die zur Bestimmung der optimalen Laufzeiten verwendet wird. Der Temperaturgradient wird so gewählt, dass die in der perpendikulären TGGE ermittelte Schmelztemperatur genau in dessen Mitte liegt. Die Proben der jeweiligen Exone werden in Abständen von 30 Minuten auf das Gel

aufgetragen, bis die zuerst geladene Probe eine maximale Laufdauer von fünf Stunden erreicht hat, während die zuletzt geladene Probe nur 30 Minuten im Gel gewandert ist. Anhand der Abnahme der Laufabstände der hintereinander geladenen Proben ist, in Abhängigkeit von der Laufdauer, ersichtlich, wann es zu einer Bremsung des aufschmelzenden Amplifikates im Gel kommt. Die Zeit, bei der die Proben ihre Schmelztemperatur erreichen, ist die minimal adäquate Zeit, um im Falle einer Punktmutation auch die Trennung der Heteroduplices zu erreichen. Die so ermittelten Laufzeiten für die jeweiligen Exone sind ebenfalls in Tabelle 4.3 aufgeführt.

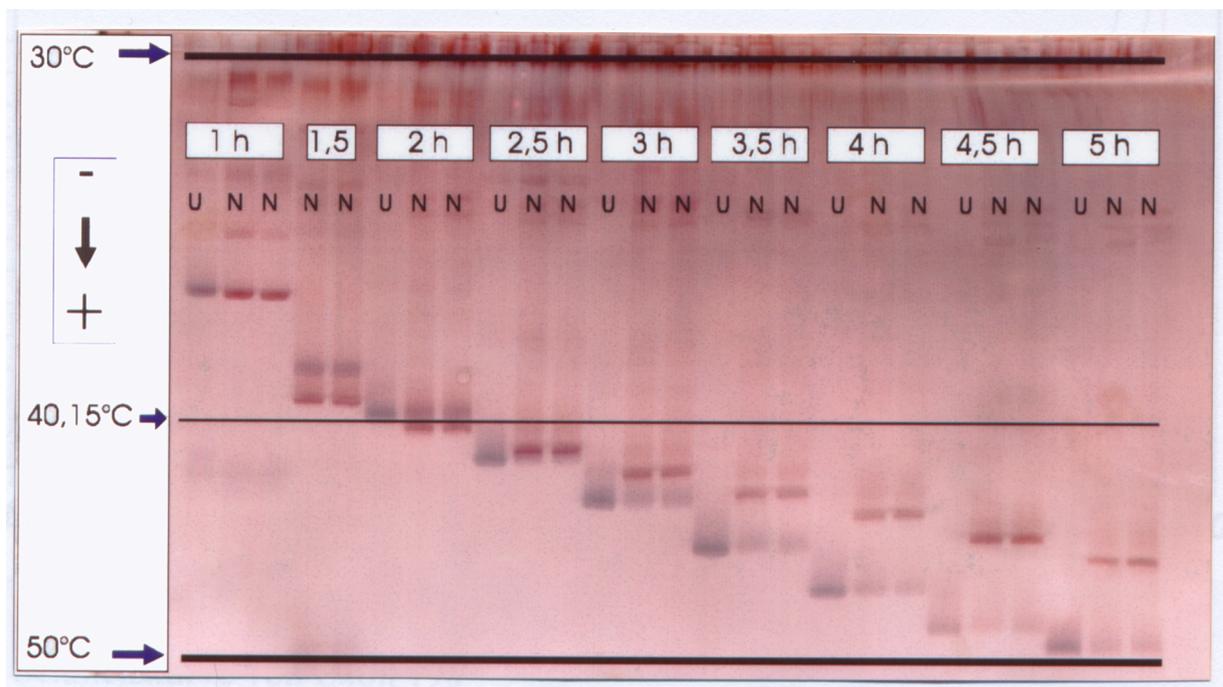


Abbildung 4.2.: "Travelschedule-TGGE" Zur Optimierung der Laufzeiten

Nachdem Schmelztemperatur und die optimale Laufzeit für jedes der zu untersuchenden Exone bestimmt worden war, wurden die Patientenproben Exon für Exon auf abnorme Bandenmuster hin untersucht. Fand sich eine veränderte Verteilung der Banden, wurde die Probe des jeweiligen Patienten der DNS-Sequenzierung zugeführt. Ein auffälliges Bandenmuster zeigte sich beispielsweise bei der Analyse der PCR-Produkte von drei nichtverwandten Patienten in Exon 24. Jede der drei in diesem Exon gefundenen Mutationen führte zu einem unterschiedlichen Banden-Muster. Die Mutation c.3037G>A wurde bei den Patienten B15 und D60 (nicht verwandt) gefunden. Die Mutation c.2855+1 G>T wurde bei Patient D54 und die Mutation c.3058A>G bei B47 gefunden.

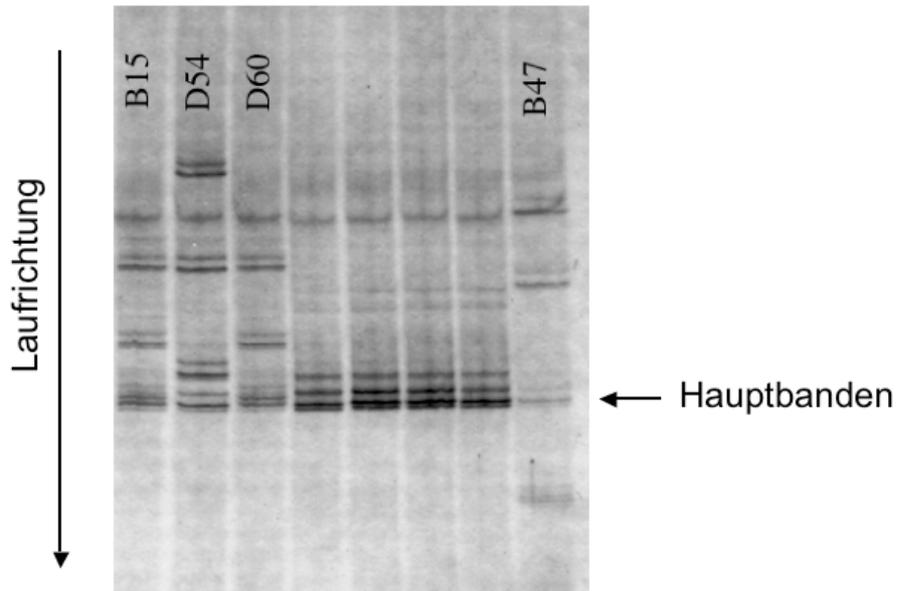


Abbildung 4.3.: TGGE Exon 24, jede Mutation führt zu einem eigenen Bandenmuster

### 4.3.3. Duplex-TGGE

Sechs Exone (32&36, 33&37, 34&38) konnten kombiniert als Duplex-TGGE untersucht werden, da sich hier bei gleicher Laufzeit und gleichem Temperaturgradienten die Banden der jeweiligen Exon so gut von einander trennten, dass eine parallele Auswertung möglich war.

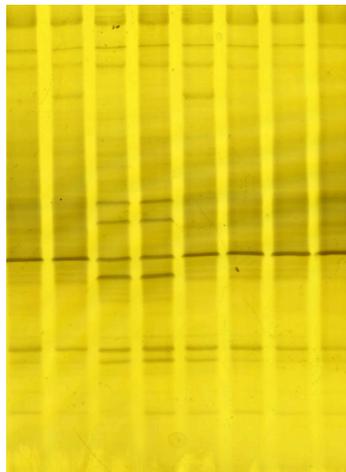


Abbildung 4.4.: Duplex-TGGE

Exon	Primer	Position (bp)	Length (bp)	PCR (Ta, Mg)	TGGE
1	5'-GCA-AGA-GGC-GGC-GGG-AG-3'(s) 5'-Ps-(AA)G-TCA-TCC-TGC-CCG-TTG-TTC-TG-3' (as)	(-36 before ATG, +72)	272+2 bp	64°C	30°-60°C, 3.5h
2	5'-Ps-(AA)T-CTG-CCA-GGA-TTC-ATC-TTG-C-3' (s*) 5'-Ps-(AA)C-AAC-ACA-ACA-AAA-GAA-GGA-C-3' (as)	(-114, +51)	248+4 bp	56°C	25°-55°C, 2h
3	5'-GTT-CCA-AAT-CCA-TGT-GCT-AA-3' (s) 5'-Ps-AAT-GGG-TAT-AAC-CAC-ATA-AAA-TAA-3' (as)	(-42, +53)	194 bp	55°C	30°-60°, 2.5h
4	5'-Ps-AAC-TCC-TGT-GAG-CTG-TTG-C-3' (s*) 5'-GCT-GTG-TCC-CAG-GTA-ATC-G-3' (as*)	(-69, +106)	271 bp	61°C	25°-55°C, 3h
5	5'-TTA-TTT-TCA-GGT-AAA-GCG-TCT-CA-3' (s) 5'-Ps-(AA)C-CGG-GTA-CCA-GCA-TGT-CTT-3' (as)	(-44, +46)	186+2 bp	48°C	30°-60°C, 2.5h
6/1	5'-Ps-(AA)G-ATG-GTT-CCT-GCT-TTT-CTG-G-3' (s) 5'-GCA-CAG-CAG-AGC-GTT-TTT-G-3' (as)	(-53, +632[cDNA])	148+2 bp	58°C	30°-60°C, 2h
6/2	5'-CAA-CTC-AGC-GGG-ATT-GTC-T-3' (s) 5'-Ps-AAT-CCA-TTA-ATA-ATT-CCA-TCA-GC-3' (as)	(+592[cDNA], +33)	208 bp	58°C	30°-60°C, 2.5h
7	5'-TCT-GCA-ATG-AAT-TTC-ATA-TGA-G-3' (s) 5'-Ps-(A)AC-TAC-ACC-CCC-CAA-CTG-C-3' (as)	(-59, +38)	223+1 bp	56°C	30°-60°C, 3.5h
8	5'-Ps-(A)AC-TGA-CGA-ATG-GTT-TTA-TAT-TG-3' (s) 5'-TAC-ACA-AAC-CAT-GCA-TGC-TG-3' (as)	(-61, +37)	224+1 bp	52°C	30°-60°C, 2.5h
9	5'-Ps-(A)AC-AAG-TAT-TAT-CTC-AGC-GAT-GTG-T-3'(s) 5'-CTG-GGA-TGG-GAT-ATT-CTG-C-3' (as)	(-52, +41)	252+1 bp	52°C	30°-60°C, 2.5h
10	5'-Ps-(AA)G-CTG-TTG-TGT-TTT-GTT-TTG-TT-3' (s) 5'-Ps-AAT-GCA-AGA-AAA-ATA-ACT-AGA-TGA-3' (as)	(-33, +39)	252+2 bp	58°C	30°-60°C, 2.5h
11	5'-Ps-AAC-TGA-TGA-AAG-ATA-CCA-TAG-TTA-3' (s) 5'-AGA-ATT-ACA-ACA-GAC-CCT-TG-3' (as)	(-56, +47)	244+1 bp	51°C	30°-60°C, 2h
12	5'-Ps-(AA)T-GCA-CTA-AAA-TAC-ATT-GTG-CTT-TG-3' (s) 5'-CCA-CAT-TCC-ACG-TCA-GGA-G-3'(S)	(-27, +31)	178+2 bp	56°C	25°-55°C, 2.5h
13	5'-Ps-(AA)C-CAA-ATA-AAG-CTA-TTT-CTT-CTT-3'(s) 5'-Ps-(AA)G-AAG-GAG-AGA-GCT-AAC-ATT-AGT-AT-3' (as)	(-39, +35)	200+4 bp	50°C	30°-60°C, 2.5h
14	5'-Ps-(A)GG-TCAT-AAG-AAA-ATG-TAT-GTT-TTG-T-3' (s) 5'-(AA)G-CAC-GTG-AAG-AAC-ATG-ATC-TAG-G-3'	(-34, +39)	196+3 bp	58°C	30°-60°C, 2.5h
15	5'-Ps-(AA)T-CAT-TTT-TAA????GTG-CCT-TTC-T-3' (s) 5'-Ps-(AA)T-CAT-AAG-GTT-AGC-CAT-GAT-GTT-3' (as)	(-32, +31)	188+4 bp	55°C	30°-60°C, 3.5h
16	5'-Ps-(AA)G-GGG-TTC-TCA-TCT-GTT-TGA-AGT-3' (s) 5'-CAG-TAC-GAG-GGC-ATC-TCC-AT-3' (as)	(-56, +32)	241+2 bp	55°C	30°-60°C, 3.5h
17	5'-Ps-(AA)G-ATC-TAC-CTG-TTC-TGC-AAA-CA-3' (s) 5'-GTA-AAT-TTT-GAA-AGG-AAT-CCT-T-3' (as)	(-55, +24)	133+2 bp	54°C, 2.5 Mg	30°-60°C, 2h
18	5'-Ps-(A)AT-TGA-TTT-TGA-CCT-TTT-TTG-TG-3' (s) 5'-AAT-GTT-TCA-GAA-AAT-GGG-TAA-A-3' (as)	(-29, +37)	186 bp	50°C	25°-55°C, 3h
19	5'-Ps-(AA)G-GCC-CTT-TTT-AAG-TGT-TTA-TT-3' (s) 5'-Ps-(AA)C-ACA-GTA-TAA-GAA-CAA-AAA-TAT-GGT-3'(as)	(-37, +29)	192+4 bp	53°C	30°-60°C, 3.5h
20	5'- ACT-AGA-TTT-TAG-CAG-TAA-TGT-TAG-A-3' (s) 5'-Ps-(A)AG-TAT-AAC-AAC-ATT-GAT-AAA-CAT-AGA-3' (as)	(-41, +54)	214+1 bp	50°C	30°-60°C, 2.5h
21	5'-Ps-(A)AT-AGA-TTC-TAT-TAA-ATA-TTA-TTC-CCT-3' (s) 5'-TAT-AGG-AAC-CAC-AGC-ATG-G-3' (as)	(-35, +30)	203+1 bp	50°C	30°-60°C, 3h
22	5'-TTG-TTT-TCT-GTT-TTG-TTT-TTC-3' (s) 5'-Ps-(AA)C-AAA-AAT-GTA-TGG-TTT-ATA-AGT-AA-3' (as)	(-35, +35)	121+1 bp	53°C	30°-60°C, 2h

23	5'-Ps-(AA)T-ATT-AAC-TTT-ATA-CTT-TTT-TTT-TCT-3' (s) 5'-Ps-(AA)T-CGT-TAA-TAA-ATT-ATT-ATT-AGA-AA-3' (as)	(-32, +47)	207+1 bp	50°C	30°-60°C, 2h
24	5'-Ps-(AA)C-CGT-GTG-GCT-CTA-TTT-AAC-CTC-3' (s) 5'-Ps-(AA)T-TGG-CCA-TGG-AAA-ACG-TAA-C-3' (as)	40 to +26	296+4bp	58°C	30°C-60°C, 4h
25	5'-Ps-(AA)T-TTG-CCC-CAC-ATT-TTC-TTA-TTC-TT-3' (s) 5'-TCC-CCT-CTC-CTG-GCC-CTT-A-3' (as)	-28 to +36	190+2bp	49°C	30°C-60°C, 2h, 30min
26	5'-ATT-AAG-GCT-GTC-CTG-AGA-CTC-3' (s) 5'-Ps-(AA)G-AAT-CCT-TCT-CTT-TCT-GTG-TTG-3' (as)	-50 to +43	222+2bp	49°C	30°C - 60°C, 2h, 30min
27	5'-Ps-(AA)G-GCC-CCC-ACC-TTT-ACC-AT-3' (s) 5'-GAA-AGT-CTT-TGC-TCC-TTA-C-3' (as)	-37 to +19	182+2bp	52°C	35°C-65°C, 1h, 30min
28	5'-Ps-TGC-CAA-AGT-TGG-AAG-CTT-ATG-3' (s) 5'-Ps-(AA)T-AAC-ATA-ACA-TAA-CAT-AAA-ATA-AAG-3' (as)	-54 to +45	225+2bp	52°C	20°C-45°C, 2h
29	5'-Ps-(AA)C-AGA-CAT-CCA-AAC-CAT-ATC-A-3' (s) 5'-CTG-AGA-GAT-TCA-ACA-TGA-GCT-AGA-3' (as)	-49 to +34	206+2bp	52°C	35°C-65°C, 2h
30	5'-CAA-CCT-GTG-GTT-GTT-GGT-TT-3' (s) 5'-Ps-AAC-AGT-GCT-TAT-GAC-TAA-CAA-GA-3' (as)	-32 to +54	212bp	54°C	30°C-60°C, 3h
31	5'-Ps-(A)AC-TCA-ATG-ATA-TCA-AAT-AGC-TAC-A-3' (s) 5'-ACT-ACT-TAA-TAT-TTT-ATT-GTT-CTA-C-3' (as)	-51 to +39	216+1bp	55°C	30°C-60°C, 2h
32	5'-Ps-AAG-ACA-TTT-GTG-CTG-AGC-CT-3' (s) 5'-TGT-AAT-CTA-TGC-AGT-CCT-TGA-TAA-3' (as)	-48 to +50	221bp	52°C	30°C-60°C, 2h
33	5'-Ps-(A)AT-TGG-TTT-TAA-ATA-CCA-CCC-T-3' (s) 5'-AGT-TGT-TTC-CAG-CGT-GAA-3' (as)	-55 to +23	201+1bp	54°C	30°C-60°C, 3h
34	5'-Ps-(AA)C-GAG-GAA-GAG-TAA-CGT-GTG-TTT-3' (s) 5'-AGT-GGC-TTC-CCC-ATC-AGT-T-3' (as)	-35 to +21	182+2bp	53°C	30°C-60°C, 3h
35	5'-Ps-AAG-TTT-TTG-CTT-TTT-CTC-CCT-C-3' 5'-GGA-GCT-GAT-TTT-GAT-GCC-A-3'	-30 to +32	185bp	52°C	35°C-65°C, 2h, 30min
36	5'-AAC-TCC-ACT-ACT-CAC-TGT-TCG-3' 5'-Ps-AAT-ACA-CAG-TAT-GCT-TGC-TTC-T-3'	-28 to +45	196bp	Duplex Exon 32	Duplex Exon 32
37	5'-Ps-AAA-GAT-TCT-GCC-TGA-TGC-T-3' 5'-AAC-TGG-CTG-GAG-TTG-AAA-T-3'	-43 to +47	255bp	Duplex Exon 33	Duplex Exon 33
38	5'-Ps-(A)AG-ATT-CAA-AAC-AAC-TCA-ATT-TG-3' 5'-CAA-GTT-GTG-TGT-GCT-TTA-AGA-3'	-39 to +39	147+1bp	Duplex Exon 34	Duplex Exon 34
39	5'-Ps-(A)AT-TTA-CAA-TGC-TAA-AGG-AAT-G-3' 5'-AAG-ACC-TTA-TCA-TCC-TAC-CAG-3'	-42 to +31	199+1bp	54°C	30°C-60°C, 3h
40	5'-Pso-AAG-TTT-TCA-TAT-TCA-CAT-ACC-AC-3' 5'-CAT-GCA-TTA-CTG-AGA-AAA-GC-3'	-41 to +30	194bp	55°C	30°C-60°C, 2h, 30min
41	5'-Ps-(A)AT-CAC-CAA-CCC-TCC-AAT-CT-3' (s) 5'-CCT-ATA-TTT-TTG-ATA-ATG-GAG-AAA-3' (as)	(-40, +45)	244+1 bp	62°C	30°-60°C, 3.5h
42	5'-Ps-(AA)T-ATC-CTC-CGG-TCC-CAC-CTT-3' (s) 5'-CCA-GAA-AGT-TCT-GAC-AAT-GCC-3' (as)	(-35, +33)	137+2 bp	57°C	30°-60°C, 3h
43	5'-Ps-(AA)C-ACT-CAT-GAA-TGA-CTA-CTC-TGT-CT-3' (s) 5'-Ps-(AA)G-CTC-TTT-TCT-GGA-TAT-GAT-AAA-G-3' (as)	(-25, +39)	193+4 bp	54°C	30°-60°C, 2.5h
44	5'-Ps-AAT-TCA-GTT-CTC-TTC-TGC-TCG-T-3' (s) 5'-GCA-TGT-CCA-GCC-TGT-GG-3' (as)	(-37, +33)	174+2 bp	57°C	35°-65°C, 2h
45	5'-AAG-TTC-TCA-CTT-AAG-ATG-CTT-3' (s) 5'-Ps-(AA)C-AAA-TGA-AGC-TTT-CAA-CAG-3' (as)	(-32, +53)	211+2 bp	56°C	30°-60°C, 2.5h

46	5'-Ps-(A)AT-GTT-TCT-TTA-TGG-CCT-TTC-TT-3' (s) 5'-AAC-TGA-CTT-CCT-TTG-CTG-ATG-3' (as)	(-30, +39)	186+1 bp	59°C	30°-60°C, 2.5h
47	5'-Ps-AAT-TGT-TGG-GGA-CTT-TTC-3' (s) 5'-TTT-CCA-GGT-CTT-TCT-AAG-TC-3' (as)	(-23, +30)	182 bp	55°C, 3 Mg	30°-60°C, 3h
48	5'-Ps-(AA)C-CTT-ATT-TTT-CCC-TTT-TCT-T-3' (s) 5'-CGA-CAC-TCC-TCA-TTT-GCT-A-3' (as)	(-25, +38)	183+2 bp	54°C	25°-55°C, 3h
49	5'-Ps-(AA)C-ATC-GTG-TTT-GAC-TTT-GTT-3' (s) 5'-AGA-CCA-CCA-CAA-ATA-AAC-AT-3' (as)	(-40, +57)	225+2 bp	56°C	30°-60°C, 2.5h
50	5'-Ps-(A)AC-GGA-CTC-AGT-AGG-AAA-GCA-A-3' (s) 5'-ATG-GCC-CAG-AGA-GAA-ATA-CAG-3' (as)	(-50, +34)	234+1 bp	54°C	30°-60°C, 3h
51	5'-Ps-AAT-GAA-TTG-CTA-TTG-TTC-TAT-C-3' (s) 5'-AGC-AGA-TTG-AGA-ATA-CTG-AGA-3' (as)	(-46, +51)	163 bp	57°C	30°-60°C, 2h
52	5'-Ps-(A)AC-GTT-TAA-AAA-ATA-CCT-TGT-TAT-3' (s) 5'-Ps-(AA)T-TGT-AAA-GTT-CCT-ATG-GAA-GAA-3' (as)	(-49, +36)	202+3 bp	54°C	30°-60°C, 2.5h
53	5'-Ps-(AA)T-CAT-CAT-GTT-TTG-GAC-ACA-3' (s) 5'-Ps-AAT-CAA-CTG-TTC-TCT-GTT-TAA-GAG-3' (as)	(-36, +30)	186+2 bp	57°C, 2.5 Mg	30°-60°C, 3.5h
54	5'-Ps-AAG-CTG-TCC-ATG-ATC-CCT-TAT-3' (sense) 5'-TAA-AGC-TTC-CTG-GCT-TAG-AT-3' (as)	(-42, +42)	207+2 bp	54°C	30°-60°C, 2h
55	5'-Ps-(AA)G-CAG-ATA-TT-GCA-TTT-TCT-TTG-AC-3' (s) 5'-CAC-TCA-AAG-CTC-CTT-CCA-CA-3' (as)	(-51, +33)	216+2 bp	55°C	35°-65°C, 2h
56	5'-Ps-(AA)T-GGT-CAG-ATG-ACT-CTT-CTT-G-3' (s*) 5'-GTG-TGG-AGG-CTG-AGG-TTA-G-3' (as*)	(-48, +45)	219+2 bp	57°C, 2.5 Mg	30°-60°C, 3h
57	5'-Ps-(AA)TTTC-CTG-ACA-TCC-CCT-TTG-3' (s) 5'-TTC-CCT-GTA-AGT-ATT-TTT-GGA-CTA-3' (as)	(-41, +36)	284 bp	58°C, 2.5 Mg	30°-60°C, 3h
58	5'-Ps-(A)AT-GAT-ATA-TTT-CTT-AAT-TTA-TAT-TTG-T-3' (s) 5'-ATA-AGC-CAT-CAG-AAA-TAG-ACA-3' (as)	(-37, +26)	189+1 bp	54°C	30°-60°C, 2.5h

Tabelle 4.3.: Primer, PCR- und TGGE-Bedingungen

#### 4.4. In der Screeninggruppe gefundene Mutationen

Die Mutationsanalyse des *FBN1*-Gens wurde mit Hilfe der TGGE bei 126 Patienten, die nicht miteinander verwandt waren, durchgeführt. In dieser Arbeit wurden die Exone 1-58 untersucht und es wurden insgesamt 45 Mutationen gefunden, von denen 41 neuartig sind und vorher noch nicht beschrieben wurden. Alle Mutationen zeigten jeweils bei den betroffenen Patienten in der TGGE ein charakteristisches Bandenmuster, das bei keinem anderen Patienten der Screeninggruppe gefunden wurde. In allen Fällen, in denen wir auch DNS-Proben der Familienmitglieder bekommen konnten, sahen wir eine komplette Kosegregation der Mutation mit dem MFS.

Die Mutationen können in verschiedene unterschiedliche Klassen eingeteilt werden:

- 36 Missense-Mutationen, von denen 13 zu einer Substitution der konservierten Zysteinreste in den cbEGF-Modulen führten
- 4 Mutationen an konservierten Positionen von Spleißstellen, die mutmaßlich zu Spleißdefekten führen
- 3 Nonsense-Mutationen in den Exonen 21,32 und 37, die zu einer vorzeitigen Termination führen
- 1 Insertions-Mutation, bei der ein zusätzliches Nukleotid zu einer Verschiebung des Leserasters (Frameshift) führte
- 1 Deletions-Mutation, die zu einem Wegfall einer Aminosäure in der calciumbindenden Konsensussequenz des cbEGF-Moduls Nr.47 führte

Die Tabelle 4.4. auf der folgenden Seite, zeigt eine Übersicht aller in dieser Studie gefundenen Mutationen. Im Weiteren werden die gefundenen Mutationen beschreiben. Da alle in dieser Arbeit gefundenen Mutationen bereits veröffentlicht wurden (Katzke 2002, Tiecke 2001), werden nicht von allen Mutationen Sequenzbilder gezeigt, es erfolgt eine exemplarische Darstellung ausgewählter Mutationen.

#	Exon	Patient	Mutation	AS Austausch	Protein Domäne	Art der Mutation
1	2	D15	c.184C>T	p.R62C	Fib-4-cys	Missense Mutation
2	2	D55	c.184C>T	p.R62C	Fib-4-cys	Missense Mutation
3	2	B46	c.184C>T	p.R62C	Fib-4-cys	Missense Mutation
4	3	D10	c.344C>G	p.S115C	EGF 1	Missense Mutation
5	14	B3	c.1760G>A	p.C587Y	cbEGF5	Missense Mutation
6	14	B1	c.1787G>A	p.C596Y	cbEGF5	Missense Mutation
7	15	D26	c.1960G>A	p.D654N	cbEGF6/ LTBP2	Missense Mutation
8	16	B9	c.2055C>G	p.C685W	LTBP2	Missense Mutation
9	16	B19	c.2055C>G	p.C685W	LTBP2	Missense Mutation
10	16	D31	c.2042C>A	p.S681Y	LTBP2	Missense Mutation
11	16	D59	c.2047T>C	p.C683R	LTBP2	Missense Mutation
12	16	D62	c.1982G>A	p.C661Y	LTBP2	Missense Mutation
13	18	D2	c.2168-2A>G	Skip. Exon 18	cbEGF 7	Exon Skipping
14	18	D40	c.2243G>A	p.C748Y	cbEGF 7	Missense Mutation
15	18	B18	c.2168A>T	p.D723V	cbEGF 7	Missense Mutation
16	18	B65	c.2201G>T	p.C734F	cbEGF 7	Missense Mutation
17	19	B51	c.2341T>C	p.C781R	cbEGF 9	Missense Mutation
18	19	D37	c.2326T>G	p.C776G	cbEGF 9	Missense Mutation
19	21	B60	c.2581C>T	p.R861X	Fib-motif	Nonsense Mutation
20	22	D7	c.2722T>C	p.C908R	Fib-motif	Missense Mutation
21	23	B62	c.2761T>G	p.C921G	cbEGF 10	Missense Mutation
22	24	B15	c.3037G>A	p.G1013R	LTBP 3	Missense Mutation
23	24	B47	c.3058A>G	p.T1020A	LTBP 3	Missense Mutation
24	24	D54	c.2855+1G>T	Skip. Exon 24	LTBP 3	Exon Skipping
25	24	D60	c.3037G>A	p.G1013R	LTBP 3	Missense Mutation
26	27	B27	c.3344A>G	p.D1115G	cbEGF 13	Missense Mutation
27	30	B35	c.3713A>G	p.D1238G	cbEGF 16	Missense Mutation
28	31	D1	c.3898A>G	p.K1300E	cbEGF 17	Missense Mutation
29	32	B7	c.3973G>T	p.E1325X	cbEGF 18	Nonsense Mutation
30	34	D36	c.4217A>G	p.D1406G	cbEGF 20	Missense Mutation
31	34	D13	c.4223G>T	p.C1408F	cbEGF 20	Missense Mutation
32	37	D27	c.4615C>T	p.R1539X	LTBP 4	Nonsense Mutation
33	40	B22	c.4955G>A	p.C1652Y	cbEGF 24	Missense Mutation
34	43	D5	c.5417G>C	p.C1806S	cbEGF 25	Missense Mutation
35	43	B43	c.5369G>C	p.R1790P	cbEGF 25	Missense Mutation
36	44	D19	c.5297-1G>T	Skip. Exon 44	cbEGF 26	Exon Skipping
37	47	B52	c.5791-5793 delGTT	p.del V 1931	cbEGF 29	Deletion
38	48	D16	c.5993G>A	p.C1998Y	cbEGF 30	Missense Mutation
39	50	B79	c.6164+3A>G	Skip. Exon 50	LTBP 6	Exon Skipping
40	50	D30	c.6231- 6232insT	Frameshift	LTBP 6	Insertion
41	54	D67	c.6661T>G	p.C2221G	cbEGF 34	Missense Mutation
42	54	B37	c.6661T>G	p.C2221G	cbEGF 34	Missense Mutation
43	55	B45	c.6806T>C	p.I2269T	cbEGF 35	Missense Mutation
44	57	D21	c.7016G>A	p.C2339Y	LTBP 7	Missense Mutation
45	57	D63	c.7003C>T	p.R2335W	LTBP 7	Missense Mutation

Tabelle 4.4.: Übersicht der Mutationen, die in dieser Studie gefunden wurden

## 4.4.1. Missense Mutationen

### 4.4.1.1. Fib-4-Cys Motiv

Die Mutation c.184C>T, führt zu einem Austausch eines Arginins zu einem Zystein an Position 62 (p.R62C) und wurde bei drei nicht miteinander verwandten Patienten gefunden (**D15**, **D55**, **B46**). Es kommt zur Bildung eines zusätzlichen Zystein-Rest 2 Positionen c-terminal vor dem ersten der 4 konservierten Zystein-Reste für die Exon 2 kodiert (Fib-4-cys). Bei **D15** wurde im Alter von drei Monaten eine beidseitige Ektopia lentis diagnostiziert und im Alter von 23 Jahren stellte man echokardiographisch eine Dilatation der Aorta (46mm) fest. **D55** (siehe 4.1.2.1) zeigte eine isolierte Ektopia lentis. **B46** hatte ein fragliches MFS, leider waren keine genauen klinischen Details verfügbar.

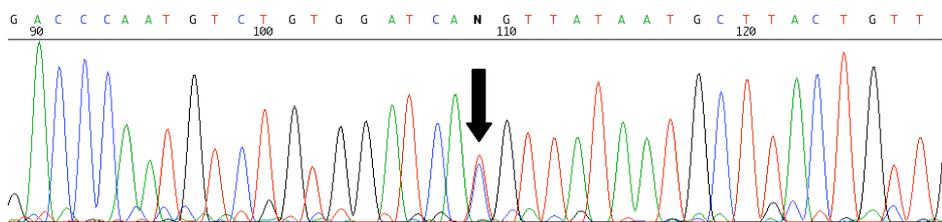


Abbildung 4.5.: Patient D55 (c.184C>T, Exon 2), Patient D15 und B46 zeigten ein ähnliches Muster

### 4.4.1.2. EGF-Motiv

Bei Patient **D10** (siehe 4.1.2.2.) zeigte sich eine Mutation in Exon 3 (c.344C>G; p.S115C), die zu einer Insertion eines zusätzlichen Zysteins im betroffenen Modul, dem ersten nicht kalziumbindenden EGF-Motiv, führte.

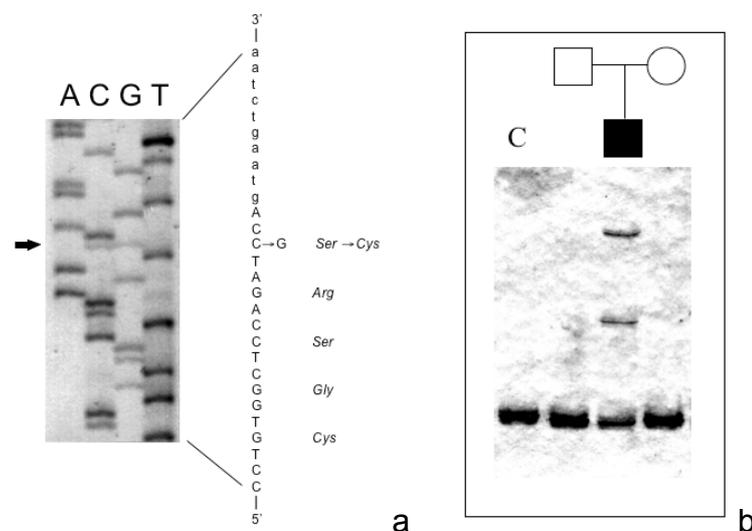


Abbildung 4.6.: a: Sequenzgel Patient D10 Exon 3; b: TGGE der PCR-Produkte von D10 und den gesunden Eltern

#### 4.4.1.3. cbEGF-Motive

20 der 36 Missense Mutationen befanden sich in verschiedenen kalziumbindenden EGF-Motiven. Darunter führten 13 zu Substitutionen der konservierten Zystein-Reste, fünf veränderten die kalziumbindende Konsensussequenz und zwei führten zu einem Austausch in einem nicht konservierten Rest.

Von den 13 Patienten mit Zysteinsubstitutionen hatten 8 ein „klassisches“ MFS. **B1** c.1787G>A (p.C596Y), **D40** c.2243G>A (p.C748Y), **B51** c.2341T>C (p.C781R), **B62** c.2761T>G (p.C921), **D5** c.5417G>C (p.C1806), **D16** c.5993G>A (p.C1998Y), **D13** c.4223G>T (p.C1408F), **B22** c.4955G>A (p.C1652Y).

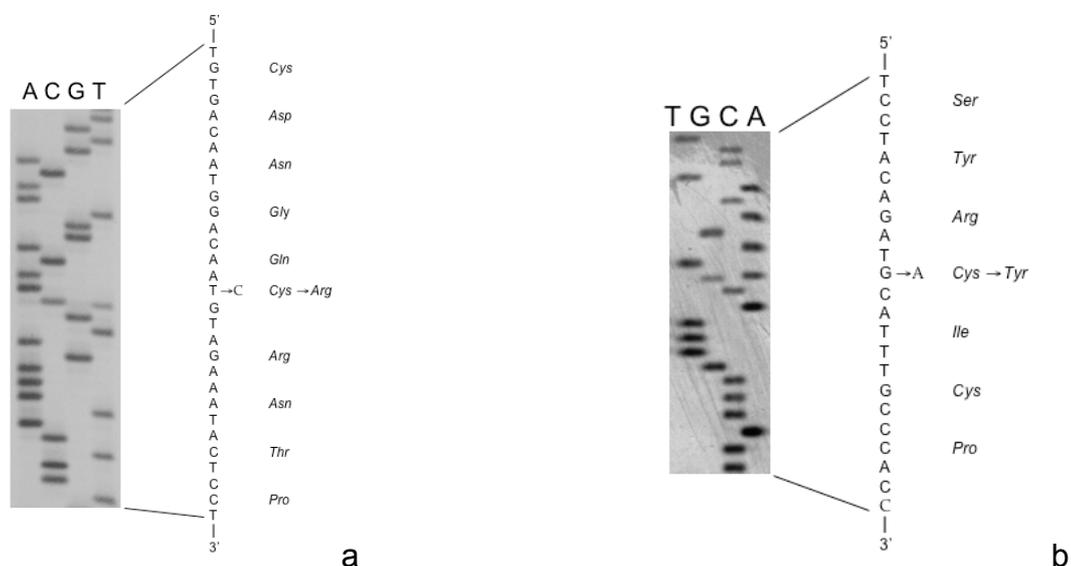


Abbildung 4.7.: a: **B51** c.2341T>C (Exon 19), b: **D16** c.5993G>A (Exon 48)

Die Patienten **B1**, **D13** und **B22** zeigten, jeweils der Mutation entsprechende Veränderungen in einem Sequenzgel nach radioaktiver Einzelstrang-DNS-Sequenzierung. Die Patienten **D40**, **B62** und **D5** zeigten nach automatischer Sequenzierung entsprechende Veränderungen.

Patient **B65**, mit der Mutation c.2201G>T (p.C734F) in Exon 18, benötigte im Alter von 15 Jahren wegen einer deutlichen Dilatation der Aortenwurzel eine operative Sanierung, sodass dieser Phänotyp die Kriterien eines „atypisch schweren“ MFS erfüllte (Tiecke 2001). Eine relativ milde klinische Beteiligung, ohne eine signifikante echokardiographisch darstellbare Dilatation der Aortenwurzel zeigten **D37** c.2326T>G (p.C776G) und **D67** c.6661T>G (p.C2221G). Jedoch wurde bei einer mit **D67** nicht verwandte Frau (**B37**), die in der 30. Schwangerschaftswoche eine akute Ruptur der Aorta ascendens entwickelte, die gleiche Mutation, c.6661T>G (p.C2221G), gefunden.

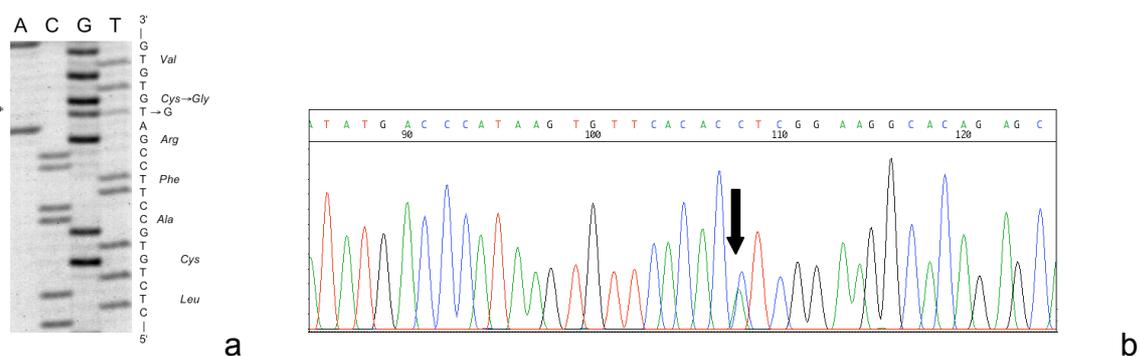


Abbildung 4.8:

a B37 c.6661T&gt;G (Exon 54)

b: D67 c.6661T&gt;G (Exon 54), Darstellung des Gegenstrang

Bei einem anderen Patienten (**B3**) war eine *de novo* Mutation in Exon 14 c.1760G>A (p.C587Y) schon früher bei einem cDNS Screening mit Hilfe der TGGE entdeckt worden (Booms 1997). Im Alter von 16 Jahren war dieser Patient noch relativ mild betroffen, dies sollte aber im Rahmen der altersabhängigen Natur des MFS-Phenotypes, als sich noch entwickelndes MFS betrachtet werden.

5 weitere Mutationen betrafen die verschiedenen konservierten Reste der kalziumbindenden Konsensus-Sequenz in unterschiedlichen cbEGF Modulen. Bei den Patienten **B35** (c.3713A>G, p.D1238G) und **B18** (c.2168A>T, p.D723V) betrafen die Mutationen den konservierter Rest an Position 2 (D/N) der kalziumbindenden Konsensus-Sequenz, 4 Reste vor dem ersten Zystein des cbEGF-Motives. Beide Patienten hatten ein „klassisches“ MFS. Zwei Mutationen befanden sich an der konservierten Position 4 (D/N), 2 Reste vor dem ersten Zystein des cbEGF-Motives. Patient **D36** (c.4217A>G; p.D1406G) hatte ein „klassisches“ MFS, während Patient **B27** (c.3344A>G; p.D1115G) eher einen ungewöhnlichen Symptomkomplex zeigte (siehe 4.1.2.6.). Eine weitere Mutation betraf zwar lediglich einen schwach konservierten Rest an Position 13, 5 Reste hinter dem 3. Zystein, aber interessanterweise entstand durch diese Mutation eine neue N-Glykosylierungsstelle. Der betroffene Patient **B45** (c.6806T>C; p.I2269T) hatte ein „klassisches“ MFS.

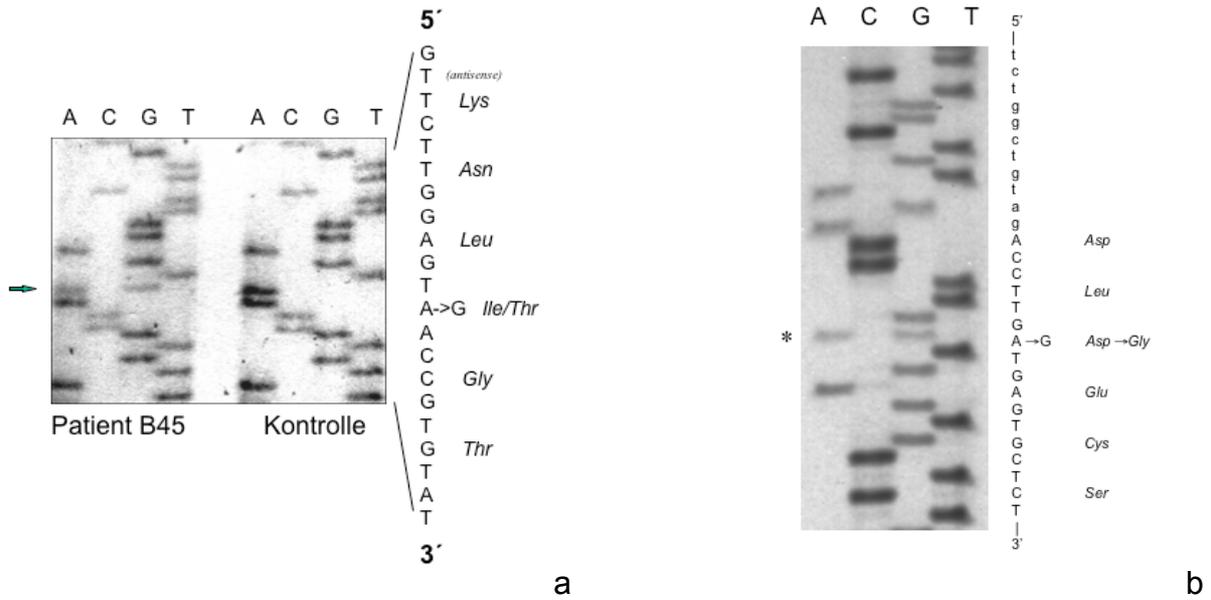


Abbildung 4.9.: a: B45 c.6806T>C (Exon 55), b: D36 c.4217A>G (Exon 34)

Mutationen, die nicht konservierte Reste in cbEGF- Motiven betrafen, wurden bei den Patienten **D1** und **B43** gefunden, die beiden ein „klassisches“ MFS hatten.

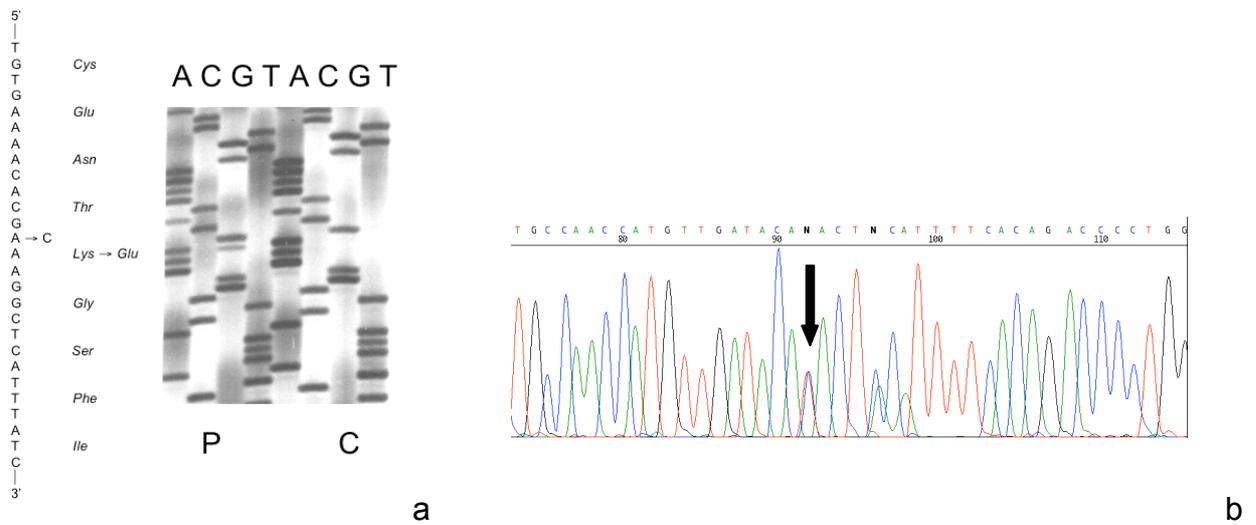


Abbildung 4.10.: a: D1 c.3898A>G p.K1300E (Exon 31) (P= Patient, C= Kontrolle)  
 b: B43 (c.5369G>C, p. R1790P)

#### 4.4.1.4. Fib-Motiv

Eine Mutation in Exon 22, einem Fib-Motiv wurde bei Patient **D7** (c.2722T>C, p.C908R), der ein „klassisches“ MFS hatte, gefunden.

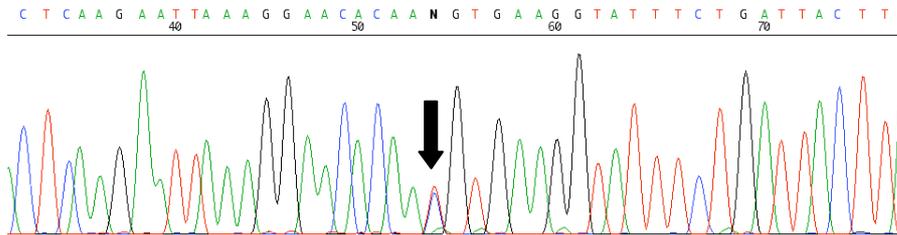


Abbildung 4.11.: D7 c.2722T>C (Exon 22)

#### 4.4.1.5. LTBP (8Cys) Motive

11 der insgesamt 15 Mutationen die in LTBP (8 Cys) Motiven gefunden wurden, waren Missense Mutationen.

5 Mutationen führten zu Veränderungen eines der 8 hoch konservierten Zysteinreste dieses Motives. Betroffen waren die nicht miteinander verwandten Patienten **B9** und **B19** die beide ein „klassisches“ MFS hatten und die gleiche Mutation in Exon 16 zeigten. Es kam zu einer C zu G Transversion an Position 2055, wobei der fünfte Zysteinrest zu einem Tryptophan ausgetauscht wurde (p.C685W).

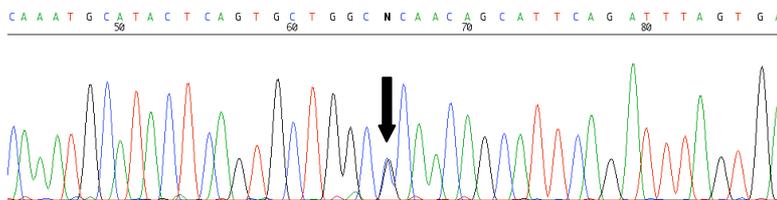


Abbildung 4.12.: B9 c.2055C>G (Exon 16)

Ebenfalls betroffen war die Patientin **D62**, eine 49 jährigen Frau, mit skelettalen und okulären Zeichen eines „klassischen“ MFS, einem echokardiographisch gesicherten Mitralklappenprolaps, jedoch keinem Hinweis auf eine Dilatation der Aortenwurzel. Bei dieser Patientin wurde die Mutation c.1982G>A in Exon 16, die den ersten Zysteinrest gegen ein Tyrosin ersetzt (p.C661Y), gefunden. Auch bei Patient **D59** wurde durch die Mutation c.2047T>A in Exon 16 der dritte Zysteinrest gegen ein Argenin ausgetauscht (p.C683R). Die Mutation c.7016G>A von Patient **D21** betraf den ersten Zysteinrest (p.C2339Y) im siebten und letzten LTBP-Modul des Gens.

Im gleichen Modul wurde auch bei Patient **D63** eine Mutation gefunden. Sie betraf aber keinen Zysteinrest, vielmehr wurde durch die Substitution c.7003C>T ein Argenin gegen ein Tryptophan ausgetauscht (p.R2335W).

Patient **D31** mit einem „klassischen“ MFS hatte an Position 2042 eine C>A Mutation, welche den Serinrest zwei Positionen vor dem dritten Zystein in ein Tyrosin umwandelte (p.S681Y). Im 2. LTBP Motiv, kodiert von Exon 15, kam es bei Patient **D26** durch die Mutation c.1960G>A, zu einer Substitution einer Asparaginsäure zu einem Asparagin (p.D654N).

Weitere Mutationen, die ein LTBP-Motiv betrafen, wurden in Exon 24 gefunden. Die Mutation (c.1013G>R), wurde bei zwei nicht miteinander verwandten Patienten (**B15**, **D60**) gefunden. Beide Patienten zeigten einen atypisch schweren Verlauf und ein frühzeitiges Auftreten erster Symptome (siehe 4.1.2.4. und 4.1.2.5.) In beiden Fällen wurde die Mutation bei den klinisch nicht betroffenen Eltern ausgeschlossen. Ebenfalls in Exon 24 wurde bei **B47**, einem Patient mit „klassischem“ MFS, die Mutation (c.3058A>G) gefunden. Sie tauschte ein Threonin an Position 1020 gegen ein Alanin aus.

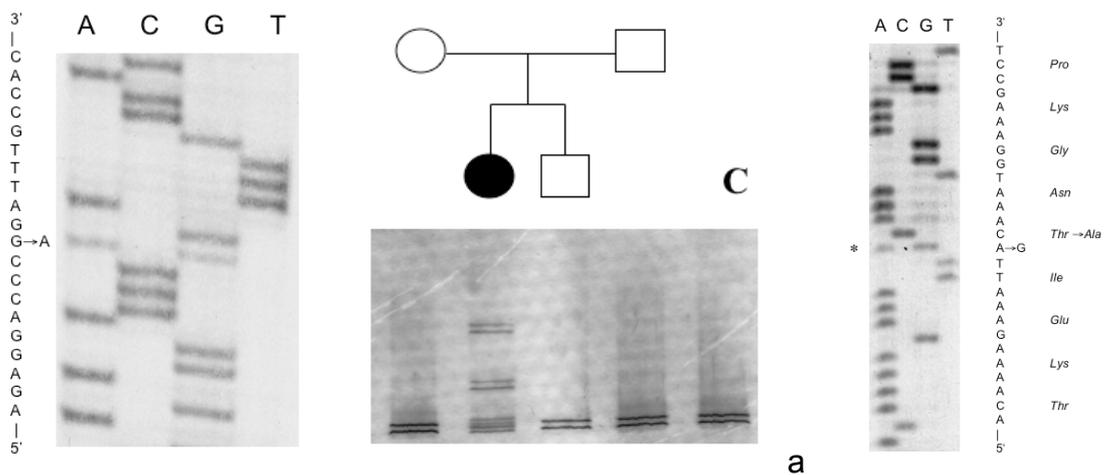


Abbildung 4.13.: a: Sequenzgel Patient D60 und TGGE der PCR Produkte von Patient D60 mit den gesunden Eltern und dem gesunden Bruder, mit Kontrolle; b: B47 c.3058A>G (Exon 24)

#### 4.4.1.6. Mutationen der Spleißsequenzen

Vier der gefundenen Mutationen betrafen konservierte Positionen an Spleißstellen. Alle vier Patienten **D2** (c.2168-2A>G), **D54** (c.2855+1G>T), **D19** (c.5297-1G>T), und **B79** (c.6164+3A>G) hatten ein „klassisches“ MFS ohne atypisch schwere klinische Merkmale. Leider konnten wir von keinem der Patienten RNA-Proben erhalten, um die Auswirkung der Mutationen auf das Spleißen zu untersuchen.

#### 4.4.1.7. Nonsense Mutation

Mutationen, die zu einem vorzeitigen Terminations-Codon und damit zum Abbruch der Proteinsynthese und vermutlich zum „nonsense mediated decay“ (NMD) führten, fanden wir insgesamt bei drei Patienten. Bei Patient **B60** kam es in Exon 21 einem Fib-Motiv durch die Mutation c.2581C>T, an Position 861 zu einem vorzeitigen Stopp-Codon. Der Patient zeigte ein isoliertes thorakales Aortenaneurysma, ohne die Kriterien der Genter Nosologie zu erfüllen (siehe 4.1.2.3). Die Patienten **B7** c.3973G>T (p.E1325X) und **D27** c.4615C>T (p.R1539X) hatten beide ein „klassisches“ MFS.

#### 4.4.1.8. Insertion und Deletion

Bei Patient **D30** kam es zu einer Insertion eines zusätzlichen Nukleotides. Zwischen die Positionen 6231 und 6232 in Exon 50 wurde ein Thymin eingeführt. Im Alter von 32 Jahren zeigte der Patient skelettale und okuläre Manifestationen, aber keine kardiovaskulären Auffälligkeiten. Eine „in frame“ Deletion von drei Nukleotiden in Exon 47, wurde bei Patient **B52** mit „klassischem“ MFS gefunden. Von der Deletion war einer der Reste der kalziumbindenden Konsensus Sequenz betroffen (5791-5793delGGT).

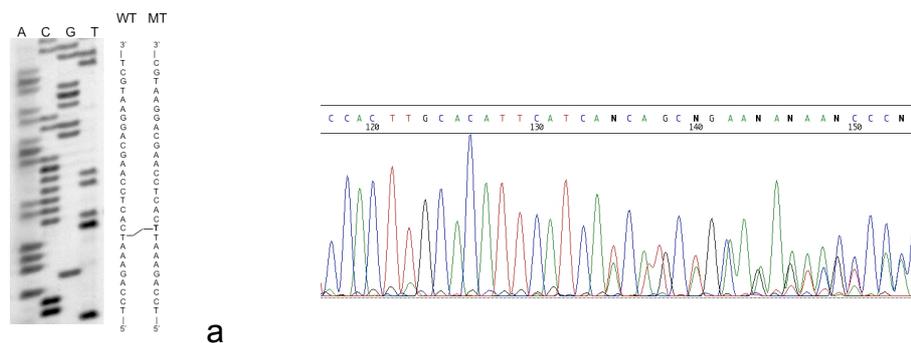


Abbildung 4.14.: a: D30 6231-6332 insT (Exon 50) b: B52 5791-5793 del GGT (Exon 47)  
Darstellung des Gegenstrangs (WT: TCATCAACATct... ,Del: TCATCATctgca...)

#### 4.4.2. Restriktionsenzyme

Bei einigen Patienten konnte mit Hilfe von Restriktionsenzymen eine Bestätigung der Mutation durchgeführt werden. Durch die Mutationen entstand entweder eine neue Schnittstelle, oder die Sequenz wurde so verändert, dass das Enzym nicht mehr schneiden konnte.

Exon	Patient	Mutation	Enzym	Schnittstelle	Konsequenz
3	D10	c.344C>G	<i>Sau3I</i>	(/GATC)	Schnittstelle zerstört
24	B15 D60	c.3037G>A	<i>Msp I</i>	(C/CGG)	Schnittstelle zerstört
24	D54	c.2855+1G>T	<i>Rsa I</i>	(GT/AC)	Schnittstelle zerstört
26	B49 B71, D14, D36	c.C3295T Polymorphismus	<i>Mae III</i>	(GTNAC)	Schnittstelle zerstört
27	B27	c.3344A>G	<i>Hph I</i>	(GGTGA(8/7))	Schnittstelle kreiert
27	B53	c.3368T>A	<i>Xcm I</i>	(CCANNNNN/NN NNTGG)	Schnittstelle kreiert
32	B7	c.3973G>A	<i>Mse I</i>	(T/TAA)	Schnittstelle kreiert
34	D36	c.4217A>G	<i>Sty I</i>	(C C[A/T] [A/T]GG)	Schnittstelle kreiert
34	D13	c.4223G>T	<i>Bmy I</i>	(GDGCH/C)	Schnittstelle zerstört
37	D27	c.4615C>T	<i>Taq I</i>	(T/CGA)	Schnittstelle zerstört

Tabelle 4.5.: Verwandte Restriktionsenzyme und die Konsequenz für die Schnittstelle durch die vorliegende Mutation

#### 4.4.3. Polymorphismen

Zusätzlich wurden in dieser Studie 10 *FBN1*-Polymorphismen entdeckt. Bei den in Tabelle 4.6 aufgelisteten Sequenzvarianten handelte es sich nicht um Mutationen, da die Allel-Frequenz in der Screeninggruppe erhöht war oder es sich um eine neutrale, nicht krankheitsverursachende Veränderung handelte.

Sequenzvariante	Lokalisation	Allel-Frequenz
1875C>T (N625N) <sup>a</sup>	Exon 15	5/252 (2%)
3294C>T	Exon 26	4/266 (1,5%)
3368T>A	Exon 27	2/350 (0,6%)
IVS28+15[TTTTA] <sub>n</sub> <sup>a</sup>	Intron 28	n=5:231/266(87%), n=6:34/266 (13%), n=8:1/266 (0,4%)
IVS40-14-15insT <sup>a</sup>	Intron 40	1/252 (0,4%)
IVS40-35C>T <sup>a</sup>	Intron 40	11/252 (4%)
5343G>A (V1781V)	Exon 43	2/252 (0,8%)
6302>T(T2101M)	Exon 50	1/252 (0,4%)
IVS57+7C>G	Intron 57	1/252 (0,4%)
IVS62+7A>C	Intron 62	1/252 (0,4%)

Tabelle 4.6.: in der Studie gefundene Polymorphismen, <sup>a</sup> dieser Polymorphismus wurde in der Literatur schon beschrieben (Liu 1998, Nijbroek 1995, Pereira 1994)

## 5. Diskussion

### 5.1. Mutationsscreening des Fibrillin-1 Gen mittels Temperatur-Gradienten-Gel-Elektrophorese (TGGE)

Die Mutationsdetektion im *FBN1*-Gen ist zum einen durch die Größe des Gens erschwert, 235kb genomischer DNS verteilen sich auf 65 Exone, zum anderen sind viele Mutationen für die jeweilige Person bzw. Familie einmalig, sodass immer die gesamte codierende Sequenz untersucht werden sollte. Zum Zeitpunkt der Studie stand bei der Mutationsdetektion v.a. die PCR-basierte Detektion von Punktmutationen im Vordergrund. Inzwischen ist die direkte genomische Sequenzierung die Methode der Wahl. Zur Einsparung des Zeit- und Kostenaufwands erfolgte ein Screening mittels Temperaturgradienten-Gelelektrophorese (TGGE) um den betroffenen Bereich (bzw. das betroffene Exon) weiter einzuengen. Es folgte dann die direkte DNS-Sequenzierung. Die TGGE wurde wegen ihrer hohen Sensitivität von über 99% (Macek 1997) und aufgrund ihrer einfachen Handhabung im Vergleich zu anderen Methoden ausgewählt. Zur Identifizierung unbekannter Mutationen stehen verschiedene Methoden des Screenings zur Verfügung und werden je nach Art der zu erwarteten Mutation gezielt eingesetzt. So können mittels Southern-blotting (Southern 1975) bis zu 50kb große, mit Hilfe der Pulsfeld-Gel-Elektrophorese bis zu 2000kb große DNS-Fragmente im Gel getrennt werden (Schwartz und Cantor 1984). Diese Methoden sind jedoch ungeeignet, kleinere Veränderungen, wie kleine Deletionen, Insertionen oder Punktmutationen zu identifizieren. Nach der Entdeckung des *FBN1*-Gen (Dietz 1991) konzentrierte sich die initiale Mutationsdetektion auf die SSCP-Analyse (Single-strand conformation polymorphism Analysis) von cDNS, die aus dermalen Fibroblasten von MFS-Patienten isoliert wurde. Die Sensitivität dieser Methode nimmt jedoch mit steigender Größe des analysierten PCR-Produktes ab und liegt bei PCR-Produkten mit einer Länge von 400bp oder mehr unter 50% (Grompe 1993). Daher waren auch die Ergebnisse der ersten Studien zur Mutationsdetektion im *FBN1*-Gen mit einer Mutationsdetektionsrate von 10- 25% eher enttäuschend (Kainulainen 1992 u.1994/ Tynan 1993). Sowohl die denaturierende Gradienten-Gelelektrophorese (DGGE), als auch die in dieser Studie verwandte Temperatur-Gradienten-Gelelektrophorese (TGGE) zeigen neben einer nahezu 100%igen Sensitivität, eine zuverlässige Analyse von PCR-Amplifikaten bis etwa 500bp (Fodde und Losekott 1994). Zusätzlich besteht die Möglichkeit, eine große

Anzahl von Proben schnell zu untersuchen. Die DGGE basiert auf demselben Prinzip wie die TGGE (siehe unten) hier wird der denaturierende Gradient durch Formamid, anstatt durch einen Temperaturgradienten gebildet. Um auf die Verwendung des toxischen Formamids zu verzichten, wählten wir für diese Studie die TGGE.

Das Prinzip der Temperatur-Gradienten-Gelelektrophorese (Riesner 1989) basiert auf der partiellen Denaturierung (Aufschmelzung) eines Doppelstrang-DNS-Fragmentes, wodurch die Laufgeschwindigkeit in einem Polyacrylamidgel stark herabgesetzt wird. Im Unterschied zur DGGE erfolgt die Denaturierung hier durch Harnstoff und einen Temperaturgradienten. Die doppelsträngige DNS dissoziiert mit allmählich ansteigender Temperatur zunächst erst in eng umschriebene, etwa 50-300bp große Schmelzdomänen. Ein für die TGGE brauchbares DNS-Fragment besteht aus mindestens zwei Schmelzdomänen mit unterschiedlicher Temperatur. Die Höhe der  $T_m$ -Werte (Schmelztemperaturen), bei denen 50% der Moleküle im Bereich der jeweiligen Domäne aufgeschmolzen sind, ist stark sequenzabhängig. Schon ein einzelner Basentausch, wie im Falle einer Punktmutation kann innerhalb der Schmelzdomäne zu einer drastischen Veränderung des  $T_m$ -Wertes führen, wie zum Beispiel bei einer Punktmutation, die den Austausch eines A/T-Paares (zwei Wasserstoffbrücken) in ein G/C-Paar (drei Wasserstoffbrücken) bewirkt, ohne dabei das Schmelzverhalten der anderen Domänen zu beeinflussen. Die zu testenden PCR-Amplifikate wandern bei der TGGE durch einen aufsteigenden Temperaturgradienten (typischerweise 30-60°). Wenn ein Amplifikat den  $T_m$ -Wert der früher schmelzenden Domäne erreicht hat und die Domäne dissoziiert, nimmt das Amplifikat eine komplexe, gegabelte Konformation ein, während der Rest des Moleküls noch doppelsträngig ist. Die elektrophoretische Laufgeschwindigkeit des Moleküls nimmt durch das partielle Aufschmelzen stark ab, da die komplexe, gegabelte Struktur nur schwer durch die Poren des Gels wandern kann. Durch die Veränderung des  $T_m$ -Wertes kommt es entweder zu einem früheren oder späteren Aufschmelzen der jeweiligen Domäne. Punktmutationen werden durch das Auftreten einer zusätzlichen Bande im TGGE-Gel entdeckt. Diese zusätzlichen Banden werden durch Heteroduplices hervorgerufen, die sich im Falle einer Mutation in den letzten Zyklen der PCR bilden. Diese Zyklen sind durch eine zunehmende Erschöpfung der *Taq*-DNS-Polymerase gekennzeichnet. Nach der Dissoziation der doppelsträngigen PCR-Produkte im Denaturierungsschritt (95°) und der Anlagerung des Primers an die Zielsequenz im Annealingschritt ( $T_a$ ) kommt es daher nicht mehr zur Verlängerung des

Primers im Extensionsschritt (72°). Nach einem kompletten PCR-Zyklus verbleiben daher Einzelstrang-DNS-Moleküle des (+) - und des (-) –Stranges, was dazu führt, dass der (+) –Strang des Wildtyp-Allels mit dem (-) –Strang des mutierten Allels reassoziieren kann und umgekehrt. Die zwei resultierenden Heteroduplices besitzen daher eine Fehlpaarung an der Position der Punktmutation, was zu einer deutlichen Senkung der Schmelztemperatur und zusätzlichen Banden im TGGE-Gel führt. Die Schmelztemperatur der beiden Heteroduplices sind in der Regel unterschiedlich, so dass es im Falle einer Punktmutation zu Entstehung von vier neuen Banden kommt: das normale Allel (Homoduplex), das mutierte Allel (Homoduplex) und die beiden darüber liegenden Heteroduplices mit niedrigerer Schmelztemperatur (siehe Abb. 4.3).

## 5.2. Mutationen bei MFS und verwandten Erkrankungen

Seit der Entdeckung des Fibrillin-1 Gens und der ersten *FBN1* Mutation bei zwei Patienten mit MFS (Dietz 1991) wurden inzwischen über 803 *FBN1*-Mutationen bei 1013 Probanden beschrieben (Faivre 2008). Zum Zeitpunkt der Studie waren 337 Mutationen online ([www.umd.be](http://www.umd.be)) beschrieben, unter denen sich auch die 53 Mutationen dieser Studie befanden (Katzke 2002). 2005 wurden unter [www.umd.be](http://www.umd.be) 601 Mutationen beschrieben, die in die Diskussion mit einbezogen wurden.

Die Mehrheit der *FBN1*-Mutationen ist einmalig für den betroffenen Patienten oder die betroffene Familie. Die Mutationen verteilen sich über das gesamte Gen, betreffen verschiedene Bereiche und Motive, ohne dass eine eindeutige Prädelektionsstelle für eine bestimmte Region zu erkennen wäre. Ungefähr 12% der Mutationen sind mehrfach nachgewiesen worden (Collod-Beroud 2003).

Für die meisten *FBN1*- Mutationen, die bis heute beschrieben wurden, konnte bisher kein eindeutiger Pathomechanismus nachgewiesen werden. Die Mutationen produzieren oft nicht voneinander zu unterscheidende Phänotypen, sodass anzunehmen ist, dass die verschiedenen Mutationen den gleichen globalen Effekt haben. Auch wenn bisher einige potenzielle Genotyp-Phänotyp Korrelationen postuliert wurden, bleibt das zugrunde liegende molekulare Korrelat doch unklar.

### 5.2.1. Missense-Mutationen

Missense-Mutationen stellen mit ca. 60% (Datenbank: 367/601=61%) den Großteil der identifizierten *FBN1*-Mutationen dar. Die Mehrheit der Missense-Mutationen betrifft eines der 43 cbEGF-Motive des Fibrillin-1 (Datenbank: 282/367= 77%).

#### 5.2.1.1. EGF/cbEGF

##### Mutationen der hoch konservierten Zysteinreste:

13 Patienten der Studie hatten eine Missense-Mutation in den cbEGF-Modulen, die zu einer Substitution eines Zysteinrestes führte.

Exon	Patient	Nukleotid	AS	Domäne	Klinik
14	B1	c.1787G>A	p.C596Y (C4)	cbEGF5	MFS
14	B3	c.1760G>A	p.C587Y (C3)	cbEGF5	MFS
18	B65	c.2201G>T	p.C734F (C2)	cbEGF7	MFS
18	D40	c.2243G>A	p.C748Y (C3)	cbEGF7	MFS
19	D37	c.2326T>G	p.C776G(C2)	cbEGF9	milde Klinik
19	B51	c.2341T>C	p.C781R (C3)	cbEGF9	MFS
23	B62	c.2761T>G	p.C921G(C2)	cbEGF10	MFS
34	D13	c.4223G>T	p.C1408F(C1)	cbEGF20	MFS
40	B22	c.4955G>A	p.C1652Y(C1)	cbEGF24	MFS
43	D5	c.5417G>C	p.C1806S(C6)	cbEGF25	MFS
48	D16	c.5993G>A	p.C1998Y(C4)	cbEGF30	MFS
54	B37	c.6661T>G	p.C2221G(C3)	cbEGF34	Aortenruptur
54	D67	c.6661T>G	p.C2221G(C3)	cbEGF34	milde Klinik

Tabelle 5.1.: Missense-Mutationen die ein Zystein in den cbEGF-Modulen betreffen, C1-C6 steht für den jeweilig betroffenen Zysteinrest im Modul

Von den 601 in der Datenbank aufgeführten *FBN1*-Mutationen betreffen 282 die cbEGF-Motive, von diesen wiederum 140 einen der konservierten Zysteinreste. Bei 23% der aufgeführten Mutationen handelt es sich damit um Substitutionen an Zysteinresten.

C1	27 (2)	C4	25 (2)
C2	16 (3)	C5	23 (0)
C3	30 (5)	C6	19 (1)

Tabelle 5.2.:Verteilung der bekannten Mutationen, die einen Zysteinrest betreffen. In Klammern anteilig die Mutationen dieser Studie

Mutationen im ersten Zysteinrest waren mit Phänotypen assoziiert, die zu einem klassischen MFS oder zu schwereren Manifestationen führten, milde Varianten wurden weder in dieser Studie, noch in der Literatur beschrieben. Mutationen die den zweiten Zysteinrest betrafen zeigten hingegen deutlich unterschiedliche klinische Ausprägungen, vom atypisch schweren Erscheinungsbild über klassische Manifestationen, bis zu milder Ausprägung. Die in der Datenbank beschriebenen Mutationen zeigen ebenfalls sowohl klassische Phänotypen, als auch ein neonatales MFS. Veränderungen im dritten Zysteinrest waren ebenfalls mit einem breiten Spektrum an Phänotypen assoziiert. Hier führte sogar die gleiche Mutation, sowohl zu einem milden Phänotyp, als auch zu einer Aortenruptur (c.6661T>G, Exon 54, D67 und B37). Anhand der Mutation von B3 (c.1760G>A, Exon 14), die ebenfalls den 3. Zysteinrest betraf, konnte bereits gezeigt werden, dass die Substitution des dritten Zysteins im 5. cbEGF-Motiv zu einer verlangsamten Sekretion von Fibrillin-1 aus der Zelle führte, ohne dass es zu einer erkennbaren Synthesestörung oder fehlerhaften Formierung der EZM kam (Booms 1997). Mutationen, die den 4. Zysteinrest betreffen, waren v.a. mit klassischen Phänotypen assoziiert, es wurden aber auch mildere Formen, die die Kriterien der Genter Nosologie nicht erfüllen, beschrieben. Der sechste Zysteinrest zeigte ebenfalls vorrangig klassische Phänotypen, aber auch hier wurden isolierte skelettale und okuläre Manifestationen beschrieben.

Zusammenfassend gesehen, können Mutationen, die einen der 6. Hochkonservierten Zysteinresten betreffen, zu den verschiedensten Phänotypen führen. Insbesondere kann die gleiche Mutation zudem mit verschiedenen Phänotypen assoziiert sein. Die klare Zuordnung eines bestimmten Phänotyps zu einer bestimmten Zysteinsubstitution gelingt nicht, wobei jedoch die Ausprägung „klassischer“ bzw. schwerer Phänotypen die milden Manifestationen überwiegt. Möglicherweise ist die lokale Konformationsänderung durch die Substitution eines bestimmten Zysteinrestes allein nicht ausschlaggebend und der Einfluss auf die globale Struktur ist zusätzlich von der Lage der jeweiligen Domäne innerhalb des Proteins abhängig. So konnten McGettrick et al. (2000) zeigen, dass eine Störung der Kalziumbindung und damit der Konformation, sowohl einen Einfluss auf die benachbarten Domänen, als auch auf die Interdomänenregionen haben kann. Einige Interaktionen zwischen den Domänen sind kalziumabhängig, andere eher nicht. Schrijver et al. untersuchten ebenfalls die Auswirkung von Zysteinsubstitutionen und konnten zeigen, dass auch die Beziehung zu

anderen benachbarten Modulen eine wichtige Rolle im Rahmen der Pathogenese spielen kann (Schrijver 1999). Ein klinischer Vergleich verschiedener Patienten mit Zysteinsubstitutionen ließ in derselben Studie ebenfalls keine klare Genotyp-Phänotyp-Korrelation erkennen. Auffällig war jedoch ein gehäuftes Auftreten von Ektopia lentis bei Patienten mit Zysteinsubstitutionen (Schrijver 1999). Bis auf eine Ausnahme hatten alle Patienten dieser Studie mit Zysteinsubstitution ebenfalls eine Ektopia lentis (12/13, 92%). Bei der Patientin B37 lagen keine Angaben zum okulären System vor, sodass keine Aussage gemacht werden konnte. Die Ektopia lentis Frequenz liegt im Allgemeinen bei MFS-Patienten bei 60% (Maumenee 1981), bei Patienten mit Fibrillinopathien bei ca. 29% (Aoyama 1995) und scheint damit in der Subgruppe der Patienten mit Zysteinsubstitutionen gehäuft aufzutreten und ist möglicherweise Ausdruck für die insgesamt schwerere phänotypische Ausprägung der Symptome in dieser Subgruppe von Patienten. In unserer Studie hatten von 53 Patienten, bei denen eine Mutation gefunden wurde, 41 eine Ektopia lentis, das entspricht etwa 70% und liegt damit unter der Häufigkeit der Patienten mit Zysteinsubstitution, aber über der allgemein erwarteten Häufigkeit.

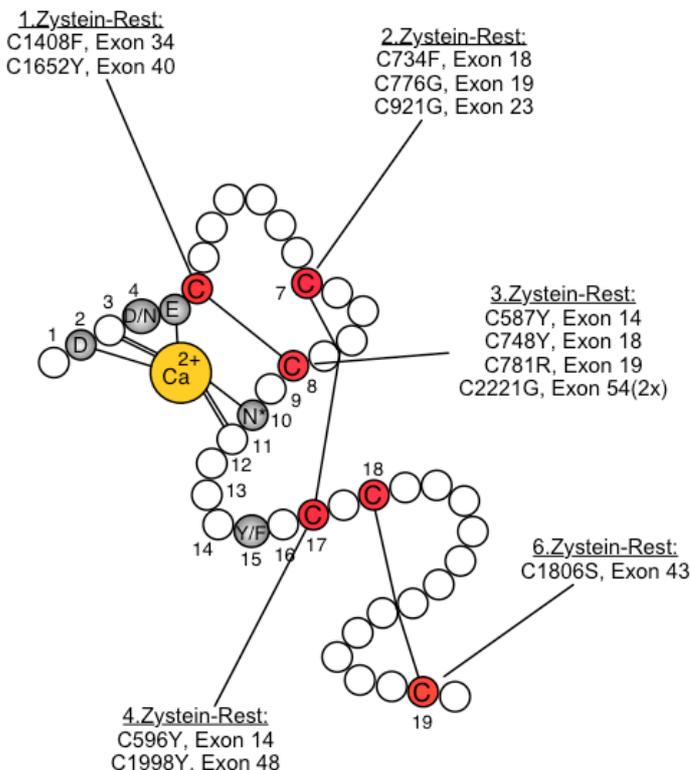


Abbildung 5.1.: Lokalisation der Mutationen in konservierten Zysteinresten

Auch die Aminosäure, die einen Zysteinrest ersetzt, hat vermutlich Einfluss auf die globale Struktur des Proteinprodukts und damit möglicherweise auf den resultierenden Phänotyp. Bei D37 (c.2326T>G, Exon 19) erfolgte ein Austausch am 2. Zystein durch Glycin, einer neutralen Aminosäure mit kleiner Seitenkette. Dieser Patient zeigte einen milden Phänotyp. In der Literatur wird eine Mutation beschrieben, die an gleicher Stelle durch den Austausch zu Tyrosin, eine AS mit aromatischer Seitenkette eingefügt. Dieser Patient zeigte einen „klassischen“ Phänotyp (Loeys 2001).

### **Mutationen in der kalziumbindenden Konsensus-Sequenz**

Die zweithäufigsten Missense-Mutationen in den cbEGF-Motiven betreffen die kalziumbindende Konsensus-Sequenz. Neben den hochkonservierten Zysteine sind weitere sechs Positionen hochkonserviert und für die Kalziumbindung von Bedeutung. Nur drei der Konsensus-Sequenz-Reste sind direkt an der Kalziumbindung beteiligt, Asp/Asn (Position 2), Gln/Glu (Position 5) und Asp/Asn (Position 10). Tyr/Phe an Position 15 erfüllt mit seiner stark hydrophoben Eigenschaft eine wichtige strukturelle Funktion. Asp/Asn an Position 4 ist indirekt an der Kalziumbindung beteiligt, indem es über die carboxylierte Seitenkette eine wichtige Wasserstoffbrückenbindung mit dem 2. Zysteinrest der Hauptkette bildet (Rao 1995). Kommt es an dieser Stelle durch Mutationen zu einem Austausch der Aminosäure, kann diese Wasserstoffbrückenbindung ggf. nicht mehr gebildet werden und es kommt zu Konformationsänderungen des Moleküls. Diese Mutationen scheinen zu einer verminderten Affinität der Kalziumbindung zu führen und einer daraus resultierenden Destabilisation der cbEGF-Domäne (Downing 1996). Zudem konnte experimentell infolge dieser Mutationen eine erhöhte Proteolyse nachgewiesen werden (Robinson und Booms 2001).

Von den 282 cbEGF-Mutationen der Datenbank betreffen 54 diese Konsensussequenz, in Klammern Mutationen dieser Studie.

Position 2	14 (2)	Position 10	10 (0)
Position 4	6 (2)	Position 13	6 (0)
Position 5	13 (0)	Position 15	5 (0)

Vier Mutationen, die in dieser Studie gefunden wurden, betrafen die kalziumbindende Konsensussequenz in verschiedenen cbEGF-Motiven.

Exon	Patient	Nukleotid	AS	Proteindomäne	Klinik
18	B18	c.2168A>T	p.D723V	cbEGF#7 (Position 2)	MFS
30	B35	c.3713A>G	p.D1238G	cbEGF#16 (Position 2)	MFS
27	B27	c.3344A>G	p.D1115G	cbEGF#13 (Position 4)	Fibrillinopathie
34	D36	c.4217A>G	p.D1406G	cbEGF#20 (Position 4)	MFS

*Tabelle 5.3.: Mutationen im Bereich der kalziumbindenden Konsensus-Sequenz*

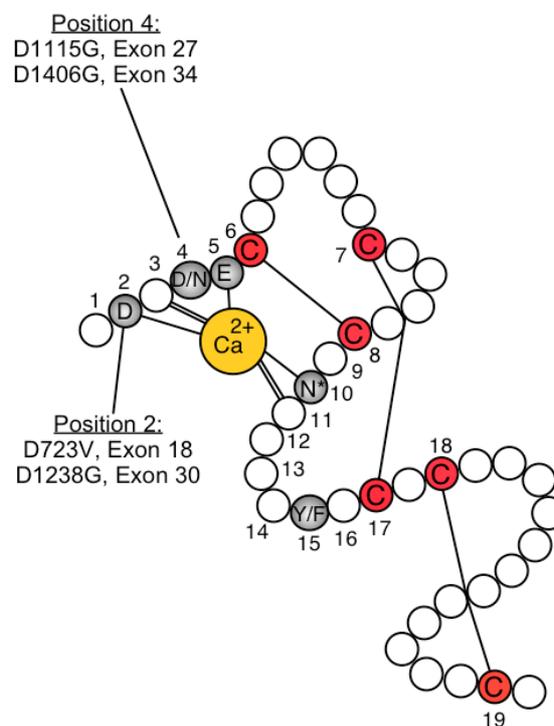
Zwei der Mutationen führten zu einem Aminosäureaustausch an Position 2 (Asp/Asn). In der Datenbank werden 12 weitere Mutationen an dieser Position beschrieben.

Exon	Nukleotid	AS	Proteindomäne	Klinik	Literatur
11/12	c.1468G>T	p.D490Y	cbEGF#3	MFS	Hayward 1997
18	c.2168A>T	p.D723A	cbEGF#7	MFS(e.o)	Dietz 1993
23	c.2728G>A	p.D910N	cbEGF#10	MFS	Collod-Bereoud 1998
25	c.3083A>T	p.D1028V	cbEGF#11	nMFS	Lo 2001
26	c.3209A>G	p.D1070G	cbEGF#12	nMFS	Collod-Bereoud 1998
27	c.3338A>G	p.D1113G	cbEGF#13	MFS	Liu 1998
27	c.3463G>A	p.D1155N	cbEGF#14	TAA	Milewicz 1996
33	c.4210G>T	p.D1404Y	cbEGF#20	MFS	Hayward 1997
46	c.5788G>A	p.D1930N	cbEGF#29	MFS	Liu 1998
52	c.6379G>T	p.D2127Y	cbEGF#32	MFS	Matsukawa 2001
52	c.6381T>A	p.D2127E	cbEGF#32	MFS	Kainulainen 1994
62	c.7820A>G	p.D2607G	cbEGF#42	MFS	Liu 1998

*Tabelle 5.4.: Übersicht der Mutationen an Position 2 der Kalziumbindenden-Konsensussequenz (e.o.= early onset)*

Sowohl bei einer in dieser Studie gefundenen Mutation (c.3713A>G, p.D1238G, B35), als auch bei drei in der Literatur beschriebenen Mutationen, kam es zu einer Substitution des Aspartats zu Glycin und damit zu einem Wechsel von einer sauren AS, zu einer neutralen AS. In einer früheren Studie konnte bereits gezeigt werden, dass der Austausch des Aspartats an Position 2, mit der ebenfalls neutralen AS Glutamin zu einer reduzierten Affinität der Domäne für die Kalziumbindung führte, die Struktur der Domäne wurde dabei jedoch nicht zerstört (Handford 1991). Die Patienten hatten ein „klassisches“ MFS, in einem Fall kam es sogar zu einem neonatalen MFS. Position 2 ist direkt an der Kalziumbindung beteiligt und eine verminderte Affinität zur Kalziumbindung scheint auch hier wahrscheinlich. Auffällig ist zusätzlich, dass es bei fast allen beschriebenen Mutationen an dieser Position zu einem Austausch zu einer neutralen AS kam. Auch die zweite Mutation an Position 2, die in dieser Studie

gefunden wurde, führte zu einem Austausch zu einer neutralen AS, zu Valin (B18, c.2168A>T, p.D723V). Eine Ausnahme macht die Mutation p.D2127E (Kainulainen 1994), hier entstand eine weitere saure AS. Auch der Wechsel von Aspartat zu Asparagin setzt die Affinität zur Kalziumbindung in einigen Modulen gleichermaßen herab, obwohl viele andere Proteine mit cbEGF-Modulen genau an dieser Stelle ein Asparagin in der Konsensus-Sequenz zeigten (Selander-Sunnerhagen 1992/ Rao 1995). Die Mutation p.D1404Y in Exon 33, beschrieben von Hayward et al. (1997), führte interessanterweise zur Zerstörung einer „Donor-Splice-Stelle“ an dieser Position. Die Analyse der cDNS zeigte, dass dafür eine „verborgene Spleißstelle“ 21 Basenpaare „upstream“ benutzt wurde, wodurch es zu einer Deletion von 7 Basenpaaren in der reifen mRNA kam. Diese Mutation wurde in einer Familie mit sehr variablen Phänotypen gefunden (Hayward 1997). Möglicherweise könnte die Nutzung weiterer „verborgener Schnittstellen“ die Variabilität der Phänotypen erklären.



*Tabelle 5.5.: Mutationen dieser Studie in der kalziumbindenden Konsensussequenz*

Die beiden anderen Mutationen die in dieser Studie in der kalziumbindenden Konsensussequenz gefunden worden, betreffen die Position 4. In der Literatur werden 4 weitere Mutationen an Position 4 der kalziumbindenden Konsensussequenz beschrieben.

Exon	Nukleotid	AS	Proteindomäne	Klinik	Literatur
12	c.1491C>G	p.N497K	cbEGF#3 (Position 4)	MFS	Datenbank
26	c.3215A>G	p.D1072G	cbEGF#12 (Position 4)	schweres MFS	Putnam 1996
31	c.3845A>G	p.N1282S	cbEGF#17 (Position 4)	MFS	Liu 1998
46	c.5679T>A	p.N1893K	cbEGF#28 (Position4)	Mild	Hayward 1997

*Tabelle 5.6.: Mutationen an Position 4 der kalziumbindenden Konsensussequenz*

Die oben beschriebene Ausbildung einer Wasserstoffbrückenbindung an Position 4, kann durch den Verlust des Asparagins erheblich gestört werden. Bei den bekannten Mutationen kommt es zu einer Substitution durch Glycin, Serin und der basischen AS Lysin. Die für die Wasserstoffbrückenbindung benötigte negative Partialladung des Asparagins wird von keiner der ausgetauschten AS zur Verfügung gestellt. Serin und Glycin sind neutral und Lysin ist sogar als basische AS mit einer positiven Partialladung ausgestattet. Eine Ausbildung der Wasserstoffbrückenbindung ist damit nicht möglich, mit den entsprechenden Folgen für die Kalziumbindung, Konformation und Interaktionen des Motives und ggf. auch der benachbarten Domänen.

### **Mutationen die andere Reste betreffen**

Mutationen dieser Gruppe sind insgesamt seltener. Am häufigsten sieht man unter ihnen Mutationen die zur Bildung eines neuen Zysteins führen (n=19). Durch diese Substitution kann es zur Ausbildung neuer, nichtnativer intra- oder intermolekularer Disulfidbrücken kommen. Zusätzlich kann es zur Entstehung einer neuen N-Glykosylierungsstelle kommen (n=15). Zudem können diese Mutationen auch einen konservierten Glycinrest betreffen, der für die Ausrichtung zweier Domänen zueinander und deren Interaktion wichtig zu sein scheint oder die Mutationen können auch an einem der nicht konservierten Reste eine Substitution hervorrufen (n=59).

In dieser Studie wurden drei Mutationen gefunden, die in diese Gruppe gehören:

Exon	Patient	Nukleotid	Aminosäure	Proteindomäne	Klinik
31	D1	c.3898A>G	p.K1300E	cbEGF#17	Mild
43	B43	c.5369G>C	p.R1790P	cbEGF#25	MFS
55	B45	c.6806T>C	p.I2269T	cbEGF#35	MFS

*Tabelle 5.7.: Mutationen die andere Reste im cbEGF betreffen*

Die Mutation c.3898A>G bei Patient D1 befindet sich an Position 12, die zwischen dem 3. und 4. Zysteinrest liegt. Positionen in diesem Bereich zeigen zum einen eine Zugehörigkeit zur kalziumbindenden Konsensus-Sequenz, zum anderen bilden sie auch eine Konsensus-Sequenz für die  $\beta$ -Hydroxylierung. Bei Patient D1 kam es an dieser

Position zu einem Austausch von Glutamin zu Lysin, einem Wechsel von einer sauren zu einer basischen AS. Beide Reste sind an dieser Stelle nicht konserviert, da sich aber durch die Substitution die Partialladung der Seitenkette ändert, können auch hier Effekte auf die Konformation des Proteins angenommen werden.

Eine weitere Klasse von Mutationen dieser Gruppe bilden Sequenzveränderungen, die eine neue Position für eine N-Glykosylierung schaffen. Bei der Konsensus-Sequenz für die N-Glykosylierung ist die Akzeptorgruppe, an die ein Oligosaccharid angehängt wird, ein Asparagin oder Aspartat und die vollständige Sequenz lautet: Asp/Asn- X- Ser/Thr, wobei X jede beliebige Aminosäure außer Prolin sein kann (Glanville 1994). Diese Art der Mutation wurde erstmals bei einem Patienten mit nMFS beschrieben. Die Mutation befand sich in Exon 25 (p.I1048T) und es konnte experimentell gezeigt werden, dass diese neue N-Glykosylierungsstelle auch tatsächlich verwendet wurde (Lönnqvist 1996). Zuckerketten sind unerlässlich für die korrekte Faltung und Stabilität der Polypeptide. Zusätzlich sind sie an Protein-Protein Interaktionen beteiligt. Mit Hilfe von Immunfluoreszenzanalysen konnten Lönnqvist et al. in vitro zeigen, dass die Formation der Mikrofibrillen infolge der zusätzlichen N-Glykosylierung erheblich gestört wird. In den mutierten Zellkulturen kam es zu einer verstärkten intrazellulären Akkumulation von Profibrillin, was darauf hindeutet, dass es zu einer verzögerten Sekretion des Peptides durch die zusätzliche N-Glykosylierung kommt (Lönnqvist 1996). Die Mutation befand sich zudem in der Konsensus-Sequenz für  $\beta$ -Hydroxylation, die durch die zusätzliche Zuckerkette beeinträchtigt war. Dadurch könnte die lokale Faltung der cbEGF-Domäne stark gestört werden, mit sekundären Effekten auf die Kalziumbindung und damit auf die Formation und Stabilität des Proteins.

In dieser Studie wurde in Exon 55 (cbEGF#35) eine Mutation gefunden, die einen schwach konservierten Rest an Position 12 betraf. Durch die Mutation wurde eine neue Akzeptorsequenz für die N-Glykosylierung geschaffen (Asn/Leu/Ile<sup>2267-2269</sup> → Asn/Leu/Thr<sup>2267-2269</sup>). Der betroffene Patient (B45) hatte ein „klassisches“ MFS. Inzwischen sind 15 weitere Mutationen veröffentlicht worden, die zur Entstehung einer potentiellen neuen N-Glykosylierungsstelle führen (p.I1048T (5x), p.I1175T, p.I1909T, p.I2269T(2x), p.I2585T (6x)). 4 Patienten zeigten ein nMFS, 8 Patienten ein „klassisches“ und bei 3 Patienten waren die Diagnosekriterien nicht komplett erfüllt.

Exon	Nukleotid	AS	Proteindomäne	Klinik	Literatur
25	c.3143T>C	p.I1048T	cbEGF#11	nMFS 4x, MFS 1x,	Collod-Beroud 1998 Jacobs 2002, Bresters 1999, Lönnqvist 1996
28	c.3524T>C	p.I1175T	cbEGF#14	fragl. MFS	Datenbank, (M. Boxer person. Com),
46	c.5726T>C	p.I1909T	cbEGF#28	MFS	Loeys 2001
55	c.6806T>C	p.I2269T	cbEGF#35	klassisches MFS 2x,	Katzke 2002, Liu 1998
62	c.7754T>C	p.I2585T	cbEGF#41	klassisches MFS 4x, inkomplettes MFS 2x	Collod-Beroud 1998, Loeys 2001, Liu 1998 Datenbank (Ades pers. Comm.)

*Tabelle 5.8.: Mutationen die zu einer neuen N-Glykosylierungsstelle führen*

Zusätzlich wurde eine zu p.I1048T analoge Mutation in Exon 25 des Fibrillin-2 Gens gefunden, die ebenfalls eine zusätzlich Konsensus-Sequenz für eine N-Glykosylierung erzeugte. Der Patient litt an einer angeborenen kontraktuellen Arachnodaktylie (Park 1998). Es zeigt sich auch bei dieser Gruppe von Mutationen kein einheitliches phänotypisches Bild. Die Häufung von neonatalen Phänotypen bei der Mutation p.I1048T ist wahrscheinlich eher auf die Lage des Exons in der neonatalen Region, als allein auf die Entstehung einer neuen Konsensus-Sequenz für eine N-Glykosylierung zurückzuführen. Denn die Mutationen vom gleichen Typ führten in den anderen Exonen zur Ausbildung eines „klassischen“ oder inkompletten MFS.

Mutationen bei denen durch den Austausch von Aminosäuren Glycin oder Prolin substituiert wird, sind ebenfalls für eine Beeinträchtigung der Domänenfaltung bekannt. Dabei kommt es bei der Aneinanderreihung von cbEGF-Motive zu Störungen der Konformation (Downing 1996). Die allererste *FBN1*-Mutation, die von Dietz et al. 1991 beschrieben wurde, betraf ein Arginin direkt vor dem 4. Zysteinrest des durch Exon 27 kodierten cbEGF#13-Moduls. In dieser Studie wurde eine analoge Mutation im cbEGF#25 Modul gefunden. Es kam zu einer Mutation (c.5369G>C) in Exon 43. Der betroffene Patient B43 hatte ein „klassisches“ MFS. Prolin ist eine große zyklische Aminosäure ( $\alpha$ -Pyrrolidincarbonsäure), die aufgrund ihrer Ringstruktur auch mit der Seitenkette am Aufbau des Peptidrückgrates beteiligt ist und damit  $\alpha$ -Helix- bzw.  $\beta$ -Faltblatt-Strukturen unterbrechen kann. Ein Wechsel von Arginin zu Prolin kann daher zu einer veränderten Faltung des betroffenen cbEGF-Moduls führen. Glycin hat im Gegensatz dazu auf Grund seiner sehr kurzen Seitenkette einen größeren Konformationsfreiraum, als irgendeine andere Aminosäure und erlaubt daher eine

große Flexibilität in der Faltung des Proteins in diesem Bereich. Es ist daher annehmbar, dass Mutationen die zur Substitution eines Prolins oder Glycins führen eine Deformation der Proteinstruktur des betreffenden cbEGF-Motives nach sich ziehen. Zusätzlich wurden auch Mutationen beschrieben, die das Glycin zwischen dem 3. Und 4. Zysteinrest betreffen. Diese Aminosäure ist bekanntermaßen an der Aufrechterhaltung der Tertiärstruktur zwischen den einzelnen cbEGF-Domänen (interdomain packing) beteiligt (Downing 1996).

In Anlehnung an die Genter Nosologie (De Paepe 1996) kann eine Fibrillin-1 Mutation nur als ein Hauptkriterium für die Diagnose gelten, wenn diese bekanntermaßen ein MFS verursacht. Da die meisten MFS-Mutationen, die bis heute entdeckt wurden für den einzelnen Patienten oder die betreffende Familie einmalig sind, ist es notwendig bei der Interpretation der klinischen und molekularen Daten vorsichtig zu sein. Alle Veränderungen der Sequenz von oder zu einem Zystein sind als pathogene Mutationen bekannt, wobei aber beachtet werden sollte, dass einige dieser Mutationen nicht mit dem „klassischen“ MFS, sondern auch mit anderen Fibrillinopathien assoziiert sein können (Palz 2000, Schrijver 1999). Die Interpretation von Sequenzveränderungen, die nicht konservierte Reste betreffen, ist schwierig. Substitutionen zu Prolin an Positionen die zu Zysteinen direkt benachbart sind, scheinen echte pathogene Mutationen darzustellen. Handelt sich es aber an dieser Position nicht um Prolin oder Glycin, sondern um eine andere Aminosäure ist die Pathogenität unsicher und es ist möglich, dass diese Veränderungen neutrale Polymorphismen darstellen.

### **5.2.1.2. N-Terminal (Exon 1-10)**

In der Region B (Exon 2-10) am N-Terminus des Proteins findet sich ein Motiv aus vier Zysteinen, das Ähnlichkeiten mit dem Fib-Motiv zeigt und daher Fib 4-Cys-Motiv genannt wird. In diesem Bereich wurde die Mutation c.184C>T bei drei nicht miteinander verwandten Patienten (D15, D55, B46) gefunden. Diese Mutation führt zu einem Austausch von Arginin zu Zystein an der Position 62. Damit kam es zu Bildung eines zusätzlichen Zysteins zwei Reste C-terminal vom ersten der vier Zysteine in diesem Fib-4Cys-Motiv.

Exon	Nukleotid	AS	Domäne	Klinik	Literatur
2	c.184C>T	p.R62C	Fib-4-Cys	MFS (EL)	Katzke 2002, D15
2	c.184C>T	p.R62C	Fib-4-Cys	EL	Katzke 2002, D55
2	c.184C>T	p.R62C	Fib-4-Cys	suspektes MFS	Katzke 2002, B46
2	c.184C>T	p.R62C	Fib-4-Cys	EL	Yu 2006
2	k.a.	p.R114C	Fib-4-Cys	MFS	Körkkö 2002
3	c.266G>T	p.C89F	EGF#1	MFS	Loeys 2001
3	c.301A>G	p.T101A	EGF#1	SkO, MI	Collod-Beroud 1998
3	c.331T>C	p.C111R	EGF#1	SkO	Hayward 1997
3	c.344C>G	p.S115C	EGF#1	SkO	Katzke 2002, D10
4	c.364C>T	p.R122C	EGF#2	SkO (EL) minor CV	Comeglio 2002
4	c.364C>T	p.R122C	EGF#2	MFS, ohne CV	Loeys 2001
4	c.364C>T	p.R122C	EGF#2	minor CV	Loeys 2001
4	c.364C>T	p.R122C	EGF#2	SkO, späte Manifestation CV	Ståhl-Hallengren 1994
4	c.364C>T	p.R122C	EGF#2	SkO, späte Manifestation CV	Black 1998
4	c.386G>A	p.C129Y	EGF#2	MFS	Nijbroek 1995
5	c.478T>G	p.C160G	EGF#3	MFS	Collod-Bereud 1998
5	c.491A>G	p.N164S	EGF#3	EL	Comeglio 2002
5	c.496T>A	p.C166S	EGF#3	MFS	Ades 2002
5	c.497G>C	p.C166S	EGF#3	MFS	Tilsra 1993
5	c.497G>T	p.C166F	EGF#3	MFS	Nijbroek 1995
6	c.640G>A	p.G214S	EGF#3	MFS	Collod-Beroud 1998
6	c.649T>G	p.W217G	Fib	MFS	Kainulainen 1994
6	c.718C>T	p.R240C	Fib	EL	Comeglio 2002
6	c.718C>T	p.R240C	Fib	EL	Körkkö 2002
6	c.718C>T	p.R240C	Fib	MFS	Loeys 2001
9	c.1098G>T	p.W366C	LTBP#1	MFS	Loeys 2001
9	c.1147G>A	p.E383K	LTBP#1	MFS	Loeys 2001

**Tabelle 5.9.: N-Terminal gelegene Mutationen**

(EL: Ektopia lentis, SkO: skelettale Beteiligung, MI: Mitralinsuffizienz, CV: kardiovaskuläre Beteiligung, minor: Nebenkriterium)

Einige Fibrillinopathien zeichnen sich durch verschiedene Kombinationen von okulären und skelettalen Auffälligkeiten aus, ohne dass es zu einer Dilatation der Aorta kommt. Im Zusammenhang mit eher milden phänotypischen Ausprägungen wurden auch Formen von isolierter Ektopia lentis (Lönngqvist 1993) und isoliert auftretenden skelettalen Manifestationen (Milewicz 1995) beschrieben. Dabei scheinen Mutationen in den letzten 7 Exonen des Gens (Exon 59 bis 65) gehäuft mit einem milden Phänotyp assoziiert zu sein (Palz 2000). Missense-Mutationen am Anfang des Gens, die vor der Prolin-Reichen Region des *FBN-1* auftreten (Exon 1-10), wurden in der Literatur ebenfalls schon mehrfach bei Patienten oder Familien mit eher milden Phänotypen, ohne Dilatation der Aorta oder mit sich erst spät manifestierenden, relativ milden

kardiovaskulären Zeichen beschrieben. Die oben genannte, in dieser Studie gefundene Mutation c.184C>T (p.R62C) zeigte bei einem Patienten ebenfalls eine isolierte Ektopia lentis, bei dem zweiten Patienten kam es neben einer Ektopia lentis jedoch auch zu Manifestationen im skelettalen System und zu einer Dilatation des Bulbus aortae, sodass hier ein „klassisches“ MFS vorlag. Beim dritten Patienten fehlten leider detaillierte klinische Angaben. Diese rekurrente Mutation wurde auch in einer chinesischen Familie mit isolierter Ektopia lentis entdeckt. Alle betroffenen Familienmitglieder zeigten die Mutation R62C (Yu 2006).

Die Mutation p.S115C in Exon 3, dem ersten EGF-Motiv, wurde bei einem Patienten dieser Studie mit Ektopia lentis und skelettalen Manifestationen ohne kardiovaskuläre Beteiligung gefunden. In der Literatur werden weitere Mutationen in den Exonen 1-10 beschrieben. Die Mutation p.R122C, in Exon 4 (EGF#2-Motiv) wurde bei drei nicht miteinander verwandten Familien mit Ektopia lentis, skelettalen Manifestationen und einem späten bzw. milden Auftreten von kardiovaskulären Veränderungen ohne Aortendissektion gefunden (Black 1998/ Comeglio 2002/ Ståhl-Hallengren 1994). Zusätzlich trat diese Mutation bei einem 15jährigen Jungen mit einem Nebenkriterium im kardiovaskulären System auf und zusätzlich bei einer weiteren Familie mit MFS ohne kardiovaskuläre Beteiligung (Loeys 2001). Die Mutation p.R240C, Exon 6 (Fib-Motiv) wurde bei zwei Patienten mit prädominanter Ektopia lentis ohne Auffälligkeiten der Aorta gesehen (Körkkö 2002/ Comeglio 2002), aber auch bei einem Patienten mit „klassischen“ MFS gefunden (Loeys 2001). Damit scheinen Mutationen am Anfang des Gens, die zur Bildung eines neuen Zysteinrestes führen, in der Mehrzahl mit einem relativ milden klinischen Erscheinungsbild assoziiert zu sein. Insgesamt sind 14 der 27 Mutationen, die bisher in den Exonen 1-10 beschrieben wurden mit einem milden Phänotyp assoziiert (52%).

### **5.2.1.3. LTBP**

Missense Mutationen in den LTBP-Motiven sind im Vergleich zu den cbEGF-Motiven deutlich seltener und betreffen meistens Zysteinreste (Robinson 2002). In dieser Studie wurden insgesamt 11 Missense-Mutationen in LTBP-Motiven gefunden. In der Literatur sind insgesamt 27 weitere Missense-Mutationen in LTBP-Motiven beschrieben.

Patient	Exon	Nukleotid	Aminosäure	Domäne	Klinik
D26	15	c.G1960A	p.D654N	cbEGF6/LTBP2	MFS
D62	16	c.G1982A	p.C661Y	LTBP2	EL, SK
B9	16	c.C2055G	p.C685W	LTBP2	MFS
B19	16	c.C2055G	p.C685W	LTBP2	MFS
D31	16	c.C2042A	p.S681Y	LTBP2	MFS
D59	16	c.T2047A	p.C683R	LTBP2	MFS
B15	24	c.G3037A	p.G1013R	LTBP3	MFS
D60	24	c.G3037A	p.G1013R	LTBP3	MFS
B47	24	c.A3058G	p.T1020A	LTBP3	SK
D21	57	c.G7016A	p.C2339Y	LTBP7	EL
D63	57	c.C7003T	p.R2335W	LTBP7	MFS

Tabelle 5.10.: : LTBP-Mutationen

5 der 11 Mutationen betrafen Zystein-Reste, die ebenfalls analog zu den cbEGF-Motiven, Einfluss auf die Struktur des Proteins haben. Auch diese Zysteinreste bilden untereinander Disulfidbrücken aus, tragen dadurch zur Struktur des Proteins bei und können durch Mutationen zerstört werden. Zwei der gefundenen Mutationen betreffen Reste, die potentiell an der Bildung von Ionenbindungen innerhalb des Motives beteiligt sind. Durch NMR-Analyse konnte gezeigt werden, dass es zwischen zwei Aminosäureresten des LTBP#6 (D2055 und R2057) zu einer Ionenbeziehung kommt, die wesentlich zur Struktur des Motives und damit auch zur Struktur des Proteins beiträgt (Yuan 1997). Die beiden gefundenen Mutationen betrafen analoge Reste in anderen LTBP-Motiven des *FBN-1*. Die Mutation, die bei Patient D26 (c.1960G>A; p.D654N) gefunden wurde, befindet sich im LTBP#2 und korrespondiert mit D2055. Die Mutation, die bei Patient D63 (c.7003C>T; p.R2335W) in LTBP#7 gefunden wurde, korrespondiert mit R2057. Auch diese Mutationen könnten die Ionenbeziehung stören, da die Aminosäuren an diesen Positionen zu neutralen Resten substituiert werden. Auch im Bereich des charakteristischen Zysteintriplets innerhalb des LTBP-Motivs werden verschiedene Mutationen beschrieben. Eine in dieser Arbeit gefundenen Mutation, führte zur Substitution von Serin zu Tyrosin (c.C2042A/ p.S681Y D31), zwei Reste vor dem Zysteintriplet im zweiten LTBP-Motiv. In der Literatur sind drei weitere Mutationen, die sich in unmittelbarer Nähe zum Zysteintriplet befinden, beschrieben worden. p.G985E und p.G985R befinden sich drei Reste hinter dem Triplet, p.V984I zwei Reste dahinter. Alle Mutationen, einschließlich der in dieser Studie gefundenen, führten bei den betroffenen Patienten zu einem „klassischen“ MFS. In wieweit Mutationen in diesem Bereich Einfluss auf die Ausbildung der Disulfidbrücken zwischen den Zysteinen haben ist noch unklar. Auffällig ist jedoch, dass alle bisher

beschriebenen Mutationen mit einem „klassischen“ MFS Phänotyp der Patienten einhergehen. Die Mutation p.G1013R war bei zwei Patienten (nicht verwandt) dieser Studie zu ungewöhnlich schweren Manifestationen assoziiert. Diese Mutation wurde erstmals von Nijbroek et al. (1995) ebenfalls bei einem Patienten mit atypisch schweren Manifestationen beschrieben. Der Patient zeigte neben einer deutlichen Dilatation der Aorta ascendens, eine panvalvuläre Dysfunktion mit konsekutiver Herzinsuffizienz. Zusätzlich kam es zu einer Ektopia lentis und schweren skeletalen Manifestationen. In der Literatur sind diese Mutationen bei fünf weiteren Patienten gefunden worden. Godfrey et al. (1995) beschrieben sie bei einem 10 Monate alten Mädchen mit atypisch schweren Manifestationen (ohne Charakteristika für ein nMFS). Auch die weiteren Mutationen, die zu einer Substitution des Glyzins führten, zeigten bei den betroffenen Patienten ungewöhnlich schwere und frühe Manifestationen der Erkrankung, in zwei Fällen ein nMFS.

Exon	Nukleotid	Aminosäure	Klinik	Literatur
24	c.3037G>A	p.G1013R	atypisch schweres MFS	Nijbroek 1995
24	c.3037G>A	p.G1013R	keine genauen Angaben	Liu 1998
24	c.3037G>A	p.G1013R	atypisch schweres MFS	diese Arbeit
24	c.3037G>A	p.G1013R	atypisch schweres MFS	diese Arbeit
24	c.3037G>A	p.G1013R	nMFS	Loeys 2001
24	c.3037G>A	p.G1013R	atypisch schweres MFS	Lo 2001
24	c.3037G>C	p.G1013R	nMFS	Ades 2002
24	c.3037G>C	p.G1013R	keine genauen Angaben	Godfrey 1995

*Tabelle 5.11.: Übersicht über G3037A-Mutationen in Exon 24*

Die Mutation p.G1013R befindet sich fünf Reste hinter dem achten und letzten Zysteinrest des dritten LTBP-Motivs und damit im Übergangsbereich zum nächsten cbEGF-Motiv. Der Glyzinrest an dieser Position ist in allen LTBP-Motiven, auf die ein cbEGF-Motiv folgt, hoch konserviert. Möglicherweise ist Glyzin, dessen Seitenkette aus einem einzigen Wasserstoffatom besteht und somit eine großen Konformationsfreiheit besitzt, besonders wichtig für die Flexibilität zwischen den Domänen oder für die Ausrichtung der LTBP-Domäne in Bezug auf das folgende cbEGF-Motiv und damit der gesamten Proteinstruktur. In diesem Übergangsbereich zwischen den Domänen wurde in dieser Studie eine weitere Mutation, p.T1020A gefunden. Diese Mutation trat in einer Familie mit variablen Manifestationen des „klassischen“ MFS auf. Es wird ein hydrophober Rest (Alanin) gegen einen polaren Rest (Threonin) ausgetauscht. Möglicherweise führt auch dies zu einer Beeinträchtigung der Interdomänenflexibilität. Zusammen mit der Mutation p.K1023N, die bei einem Patienten mit nMFS gefunden

wurden, sind in dieser Region insgesamt drei verschiedene Mutationen, die zu einem schweren Phänotyp führten, beschrieben worden.

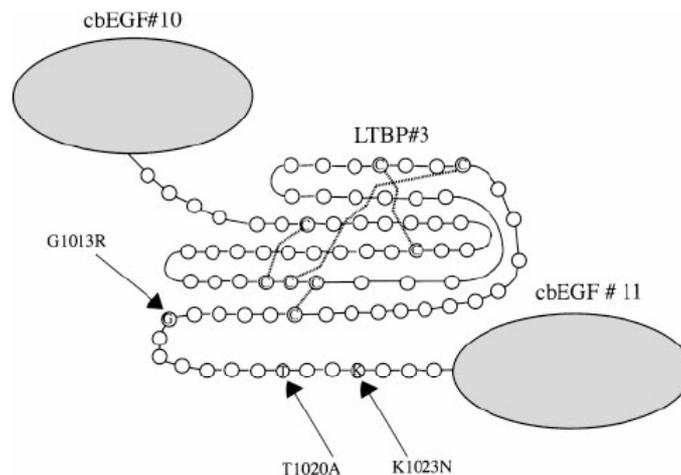


Abbildung 5.2.: : Mutationen im LTBP-Motiv

### 5.2.2. Entstehung eines vorzeitigen Stopcodons

Mutationen die zur Entstehung eines vorzeitigen Stopcodons (engl. Premature Termination Codon, PTC) führen, machen etwa ein Viertel aller bekannten Mutationen aus (150/601, 25%). Dabei handelt es sich entweder um Punktmutationen, die direkt zu einem vorzeitigen Stopcodon führen, Nonsense Mutationen, oder kleine Insertionen und Deletionen die durch eine Verschiebung des Leserasters ebenfalls zur Entstehung eines vorzeitigen Stopcodons führen. Durch diese Art Mutation kommt es zur Synthese eines verkürzten *FBN-1* Monomers, welches im Sinne eines dominant negativen Effektes mit den normalen Monomeren bei der Zusammenlagerung zu Mikrofibrillen interferieren kann. Es kommt bei diesen Mutationen oft zu einer deutlichen Reduktion der mRNA Transkripte des mutierten Alleles, einem nonsense-vermittelten mRNA-Abbau (engl. *nonsense-mediated mRNA decay, NMD*) (Dietz 1993, Schrijver 2002).

#### 5.2.2.1. Nonsense Mutationen

In der Marfan-Datenbank werden 68 Nonsense-Mutationen beschrieben (11,3%). Bei diesen Mutationen kommt es zur Entstehung eines vorzeitigen Stopcodons. Unter den Mutationen dieser Studie befinden sich auch drei Nonsense-Mutationen:

Patient	Exon	Nukleotid	AS	Motiv	Klinik
B60	21	c.C2581T	p.R861X	Fib-Motiv	AAA
B7	32	c.G3973T	p.E1325X	cbEGF#18	MFS
D27	37	c.C4615T	p.R1539X	LTBP#4	MFS

*Tabelle 5.12.: Nonsense Mutationen*

Patient B60 zeigte neben einer akuten Dissektion der Aorta ascendens und einem Hochwuchs keine typischen Zeichen des MFS. Die Kriterien der Genter Nosologie wurden nicht erfüllt, sodass dieser Phänotyp als isoliertes thorakales Aortenaneurysma einzuordnen ist. Diese Mutation wurde zusätzlich bei zwei weiteren nicht verwandten Patienten gefunden, beide mit einem „klassischen“ MFS (Schrijver 2002, Liu 1997). Auch die beiden anderen Patienten (B7 und D27) dieser Studie hatten ein „klassisches“ MFS. Eine Reihe von PTC-Mutationen mit deutlich reduzierten Anteilen von mutiertem Transkript wurde bei Patienten mit eher milden Phänotypen gesehen, sodass ein niedriger Spiegel an mutierter mRNA mit einer milderer Klinik in Verbindung gebracht wurde (Dietz 1993, Aoyama 1994). Inzwischen konnten aber auch bei Patienten mit „klassischem“ MFS niedrige Spiegel von mutierter mRNA nachgewiesen werden (Hewett 1994, Halliday 1999), so dass wohl keine allgemeingültige inverse Beziehung zwischen dem Spiegel der mutanten mRNA und dem klinischen Schweregrad zu bestehen scheint.

#### 5.2.2.2. Deletion und Insertion

In dieser Arbeit wurde eine Mutation gefunden, die zu einer Deletion führte. Bei dem Patienten B52 kam es in Exon 47 zur Deletion der Basen GTT im Bereich der Sequenz 5791-5793, dies führte zur Deletion der Aminosäure Valin an Position 1931 im kalziumbindenden EGF-Motiv 29. Der Patient zeigte klinisch ein „klassisches“ MFS mit Mitralklappenprolaps und einer resultierenden mittelgradigen Mitralklappeninsuffizienz. Bei Patient D30 (siehe 4.1.2.7.) kam es durch die Insertion eines zusätzlichen Nukleotids zu einer Verschiebung des Leserasters, zu einem Frameshift. An Position 6231 kam es zur Insertion eines zusätzlichen Thymins. In der Datenbank waren insgesamt 67 der 601 Mutationen Deletionen (11,2%). 5% der Mutationen, die in der Datenbank gelistet werden (30/601) sind Insertionen. Kleine Insertionen und Deletionen mit Verschiebung des Leserasters wirken wie Nonsense-Mutationen und führen zu einem sehr variablen Phänotyp mit milden bis schweren Manifestationen. Die Schwere des Phänotyps scheint mit der quantitativen Expression des mutierten Alleles und dem Anteil an eingefügtem verkürzten Protein in die Mikrofibrillen

zusammenzuhängen (Nijbroek 1997, Liu 2001). Besonders schwere Erscheinungsbilder werden v.a. mit der Deletion ganzer Exone in Verbindung gebracht (Blyth 2008).

### **5.2.3. Spleißfehler**

Unter Spleißen bzw. *engl.* Splicing wird die Prozessierung der prä-mRNS in reife RNS verstanden. Aus der in der Transkription gebildeten prä-mRNS werden die noch enthaltenen Introns entfernt und die angrenzenden Exons miteinander verknüpft. Mutationen in der intronischen Sequenz, die konservierte Positionen an der Spleißkonsensussequenz betreffen, können verschiedene Arten von Spleißfehlern hervorrufen. Es kann zu einem Exonskipping (Verlust eines Exons) kommen, eine kryptische Spleißstelle kann verwendet werden, Intronsequenzen können beibehalten werden und es kann zur Entstehung eines Pseudoexons innerhalb des Introns kommen (Berget 1995). Im *FBN1*-Gen führen diese Mutationen in der Regel zu einem Exonskipping. In den meisten Fällen bleibt dabei der Leserahmen erhalten, da die meisten *FBN1*-Exons ein Mehrfaches von drei Nukleotiden umfassen. Da das Level der mRNS meist nicht reduziert wird, werden so verkürzte Fibrillin-Monomere produziert, die an der Formation der Mikrofibrillen teilnehmen und damit die Mikrofibrillenformation massiv stören können, sodass meist schwere Formen des MFS resultieren (Liu 1996). 69 der 601 Mutationen in der Datenbank (11,5%) waren intronische Mutationen die zu Spleißfehlern führten. Die Mehrzahl dieser Mutationen, die mit Exonskipping assoziiert sind, wurde bei Patienten mit besonders schwerer klinischer Beteiligung gefunden, darunter auch das nMFS (Liu 1996). Die drei Mutationen der Spleißkonsensussequenz, die in dieser Studie gefunden wurden, zeigten bei zwei Patienten (D2 und D54) ein „klassisches“ MFS. Bei einem noch jüngeren Patienten (B79) hatten sich zum Zeitpunkt der Diagnose nur wenige milde phänotypische Merkmale ausgebildet, eine besonders schwere Form des MFS zeigte keiner der Patienten.

### **5.3. Genotyp-Phänotyp Korrelationen**

Die phänotypische intrafamiliäre Variabilität beim „klassischen“ MFS ist auffallend. Das klinische Erscheinungsbild, der Zeitpunkt des Auftretens der Manifestationen, die Schwere der jeweiligen Manifestationen in den verschiedenen Organen kann bei Verwandten, die die identische Mutation tragen, deutlich variieren. Dies lässt vermuten, dass die allelische Mutation nicht die einzige Determinante für die

phänotypische Ausprägung ist. Andererseits sind Genotyp-Phänotyp Korrelationen für wenigstens einen Teil der Mutationen möglich.

Gerade Mutationen in der Mitte des Gens (Exon 24-32) zeigen die Schwierigkeiten, die es bei der Beschreibung von Genotyp-Phänotyp Korrelationen bei MFS und verwandten Fibrillinopathien gibt. Mutationen dieser Region wurden bei Patienten sowohl mit klassischem, atypisch schwerem und neonatalem MFS gefunden, als auch bei anderen Fibrillinopathien (Tiecke 2001). In dieser Region wurden acht rekurrente Mutationen bei nicht miteinander verwandten Individuen gefunden. In den meisten Fällen war die phänotypische Konsequenz der individuellen Mutation relativ konsistent. Beispielsweise wurde die Mutation p.G1013R bei fünf verschiedenen Patienten gefunden, die einen Phänotyp zeigten, den wir als atypisch schweres MFS bezeichneten (Tiecke 2001) und zusätzlich bei einem Patienten mit nMFS (Loeys 2001). Die Mutationen p.I1048T und p.C1074R wurden jeweils bei Patienten mit nMFS gefunden. Die Mutation p.E1073K wurde bei zwei Patienten mit nMFS und einem Patienten mit atypischem schweren MFS gefunden, p.R1170H wurde andererseits bei zwei nicht verwandten Familien mit recht mildem Phänotyp ohne Aortendilatation und Dissektion gefunden. Zudem zeigte sich in keinem Fall die gleiche Mutation bei einem Patienten mit „klassischem“ MFS und einem Patienten mit nMFS.

Der Vergleich analoger Mutationen in verschiedenen Regionen des Gens lässt vermuten, dass der Ort der Mutation entlang des Fibrillin Peptides auch eine wichtige Determinante für die Schwere der Mutation ist. Es gibt mehrere Beispiele von Mutationen, die Analoge Positionen in verschiedenen cbEGF Modulen betreffen, und mit verschiedenen klinischen Phänotypen assoziiert sind (Palz 2000).

Bei Mutationen im cbEGF-Motiv, die die kalziumbindende Konsensus-Sequenz betreffen, scheint auch der Domäne-Kontext Einfluss auf die strukturelle Konsequenz der Mutation zu haben. Dies könnte die Beobachtung erklären, dass Mutationen an analogen Positionen in verschiedenen cbEGF Modulen mit einer Bandbreite verschiedener Phänotypen assoziiert sind (McGettick 2000).

### **5.3.1. Neonatales Marfan-Syndrom (nMFS)**

Das nMFS bildet im Spektrum der klinischen Manifestationen der Fibrillinopathie die schwerst wiegende Erscheinungsform. In unserer Arbeit zeigte sich eine deutliche Häufung von neonatalen Mutationen in den Exonen 24-32. Wobei in den Exonen 24-28

hauptsächlich Missense Mutationen und in den Exonen 31 und 32 Exon-Skipping Mutationen gefunden wurden (Booms 1999).

### **5.3.2. Atypisch schweres MFS**

Putman et al. waren die Ersten, die eine schwere Form des MFS beschrieben, die sich vom nMFS unterscheidet. Es kommt bereits in der frühen Kindheit zu schweren kardiovaskulären Komplikationen, die oft eine chirurgische Intervention notwendig machen. Zusätzlich kann es auch hier zu Auffälligkeiten des Gesichts und der Ohren, sowie zu angeborenen Kontrakturen kommen (Putman 1996). Auch in dieser Studie zeigten zwei Patienten (B15 und D60), die nicht miteinander verwandt waren, atypisch schwere Manifestationen des MFS (siehe auch 4.1.2.4 und 4.1.2.5). Bei beiden Patienten konnte die gleiche Mutation c.3037G>A (p.G1013R) in Exon 24 nachgewiesen werden (Abbildung 4.3.).

Da es bisher beim MFS kein allgemein akzeptiertes Graduierungssystem gibt, erscheint die Definition des atypisch schweren MFS auf der Grundlage des Auftretens schwerer kardiovaskulärer Manifestationen in der frühen Kindheit sinnvoll, da die kardiovaskulären Ereignisse die Haupttodesursache dieser Erkrankung darstellen. Normalerweise entwickelt sich die aneurysmatische Erweiterung der Aorta mit fortschreitendem Alter (Lipscomb 1997). Als atypisch schweres MFS kann daher ein MFS beschrieben werden, das sich durch die frühe Entwicklung schwerer kardiovaskulärer Manifestationen auszeichnet, die vor dem vollendeten 16. Lebensjahr auftreten (Tiecke 2001). Diese Patienten scheinen, aufgrund des bekannten hohen Grad an phänotypischer Variabilität des MFS, eine heterogene Gruppe zu bilden. Auffällig in dieser Gruppe ist eine Häufung von Mutationen in den Exonen 24-32. Da es hier auch vermehrt zum nMFS kommt, scheint diese Region eine funktionell besondere Rolle zu übernehmen. Die oben erwähnte Mutation c.3037G>A scheint dabei einen „Hotspot“ für diesen Phänotyp zu bilden (Tiecke 2001).

### **5.3.3. Mild ausgeprägtes MFS**

In den letzten Jahren wurden verschiedene Fibrillinopathien beschrieben, die sich durch Variationen von okulären und skelettalen Manifestationen, z.T. auch isoliert, ohne Beteiligung des kardiovaskulären Systems auszeichneten (Milewicz 1995/ Lönnqvist 1993). Aus den bis heute bekannten Daten scheinen Mutationen in den letzten sieben Exonen des *FBN1*-Gen (Exon 59-65) vermehrt mit einem milden Phänotyp assoziiert zu

sein. In einer vorherigen Studie der Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass Mutationen an analogen Positionen in den 43 cbEGF-Modulen des *FBN-1* mit milden Phänotypen assoziiert waren, wenn sie sich in einem der sechs C-terminalen Module (Exon 59-63) befanden, aber zu einem „klassischen“ MFS oder atypisch schwerem MFS führten, wenn sie in anderen Regionen des Gens gefunden wurden (Palz 2000).

Missense Mutationen die sich vor der prolinreichen Region des Fibrillin-1 (Exon 1-10) befanden wurden in der Literatur oft bei Patienten mit milden kardiovaskulären oder erst im späteren Alter auftretenden Aortendilatationen beschrieben (Robinson 2002). Auch die Mutationen die in dieser Studie in der N-Terminalen Region gefunden wurden, waren vermehrt mit einem milden Phänotyp assoziiert.

### **5.3.4. Fibrillinopathien**

Neben dem „klassischen“ MFS werden Mutationen im *FBN1* auch noch bei anderen Erkrankungen gefunden. Neben dem nMFS und dem atypisch schweren MFS wurden Mutationen in diesem Gen auch bei isolierten Aneurysmen und Dissektionen der Aorta ascendens gefunden, zusätzlich bei isolierten skelettalen Manifestationen, isolierter Ektopia lentis und anderen. Viele dieser Mutationen, die nicht zum „klassischen“ MFS führen, wurden jeweils nur bei einer betroffenen Familie oder einem einzelnen Patienten beobachtet, sodass hier eine Aussage über Phänotyp-Genotyp Korrelationen fast unmöglich ist. Auch wenn im Rahmen dieser Arbeit versucht wurde, einen Überblick über das Spektrum der durch *FBN1*-Mutationen hervorgerufenen Erkrankungen zu bringen, ist es immer noch nicht möglich, eine molekuläre Ursache für die jeweilige Manifestation zu benennen.

### **5.3.5. Bedeutung für den Patienten**

Findet sich bei einem Patienten eine Mutation im *FBN1*-Gen, von der vermutet wird, dass sie pathogen ist, können Familienmitglieder auf diese Mutation hin untersucht werden. Dies ist vor dem Hintergrund wichtig, dass eine pathogene Mutation bei einem Verwandten ersten Grades ein Hauptkriterium in der Genter Nosologie darstellt. Angehörige die ebenfalls eine Mutation tragen, können durch eine frühe Diagnose ggf. rechtzeitig von präventiven Maßnahmen profitieren, beispielweise von einer pharmakologische Therapie mit AT-1 Blocker und/oder Betablockern oder auch von einer chirurgischen Intervention.

Jedoch sind über 90% der bis heute gefunden Mutationen für den jeweiligen Patienten, bzw. die Familie einmalig. Auch zeigen Familien mit der gleichen Mutation deutliche phänotypische Variationen, sodass eine Übertragung der Genotyp-Phänotyp Korrelationen weiterhin schwierig bleibt. Zudem zeigen ca. 25% der Patienten eine Neumutation. Ein generelles Screening des *FBN1*-Gens bei Patienten mit V.a. MFS, ohne den Nachweis einer pathogenen Mutation in der Familie, scheint damit eher nicht sinnvoll zu sein. Die Mutationsanalyse hat eine ergänzende Rolle, es sollte die klinische Diagnose nach den Kriterien der Genter Nosologie im Vordergrund stehen.

### 5.4. Mutations-Detektions-Rate

In der vorliegenden Studie wurden 126 Patienten mit „klassischem“ MFS (n=78), „suspektem“ MFS (n=32) und Patienten mit mehreren anderen Manifestationen, die mit Fibrillinopathien überlappen auf *FBN1*-Mutationen untersucht. Die Detektionsrate für Patienten mit „klassischem“ MFS lag bei 51% (40/78), wohingegen die Detektionsrate für Patienten mit Manifestationen, die lediglich an ein MFS denken ließen und nicht die Kriterien der Genter Nosologie erfüllten, nur bei 12% lag (4/32).

Warum die Mutations-Detektionsrate für *FBN1* so gering ist, und nur für einen Teil der heute diagnostizierten Patienten eine Mutation gefunden werden konnte, ist noch nicht vollständig klar. Bei Patienten mit „klassischem“ MFS, die die Genter Kriterien erfüllten, ist die Detektionsrate höher, dies entspricht auch den Ergebnissen unserer Studie. Möglicherweise führt eine klinische Überdiagnose des MFS zu einer niedrigen Detektionsrate. Andererseits blieb die Mutations Detektionsrate in prospektiven Studien mit einer großen Anzahl an Proben, sogar in Untergruppen mit Patienten mit „klassischem“ MFS durchweg niedrig. Zusätzlich haben die meisten Studien, inklusive dieser, PCR basierte Methoden verwandt, die für die Detektion von Punktmutationen oder anderer kleiner Läsionen in Exonen und flankierenden Intron-Sequenzen am besten geeignet sind. Größere Läsionen, wie beispielsweise genomische Multiexon Deletionen die von anderen Arbeitsgruppen identifiziert wurden (Kainulainen 1992/ Liu 2001/ Matyas 2007), können mit den PCR-basierten Methoden nicht gefunden werden.

Zudem ist es denkbar, dass es ein Reservoir an *FBN1*-Mutationen außerhalb der bis heute intensiv studierten DNS-Sequenzen gibt oder dass die Läsionen, die nicht so leicht mit der exonweisen PCR detektierbar sind, sehr viel häufiger vorkommen als es heute von uns angenommen wird. Bereits 1994 konnte bei einer großen französischen

Familie mit marfanähnlichem Phänotyp ein Linkage zum *FBN1* ausgeschlossen werden und es zeigte sich mit Hilfe von Kopplungsanalysen eine Verbindung zum kurzen Arm auf Chromosom 3 (3p24.2-p25) (Collod1994). 10 Jahre später konnte hier durch den Nachweis von Mutationen im Gen für den TGF $\beta$ -II Rezeptor ein zweiter MFS-Lokus bestätigt werden (Mizuguchi, 2004).

Methoden	Mutationen bei klassischem MFS	Mutationen gesamte Screeninggruppe	Literatur
cDNA SSCA	4/32 (12.5%)	4/44 (9%)	Tynan 1993
cDNA SSCA	9/39 (23%)	10/40 (25%)	Kainulainen 1994
gDNA HA	7/9 (78%)	7/9 (78%)	Nijbroek 1995
Long PCR (cDNA)	6/55 (11%)	6/60 (10%)	Liu 1996
gDNA HA	-	17/60 (28%)	Hayward 1997
gDNA DHPLC	34/61 (56%)	39/93 (42%)	Liu 1998
gDNA SSCA	8/34 (24%)	8/34 (24%)	Perez 1999
gDNA HA	8/10 (80%)	8/14 (57%)	Halliday 1999
gDNA EMD	3/4 (75%)	3/6 (50%)	Youil 2000
gDNA SSCA	6/38 (16%)	6/38 (16%)	Oh 2000
gDNA direct sequencing	9/20 (45%)	9/20 (45%)	Matsukawa 2001
gDNA SSCA	7/10 (70%)	7/10 (70%)	Comeglio 2001
gDNA and cDNA CSGE and SSCA	62/94 (66%)	71/171 (42%)	Loeys 2001
gDNA CSGE	14/16 (88%)	16/24 (67%)	Körkkö 2002
gDNA TGGE	40/78 (51%)	53/126 (42%)	diese Studie
<b>Total</b>	<b>217/500 (43%)</b>	<b>264/739 (36%)</b>	

Tabelle 5.13.: Mutationsdetektionsrate in Studien mit *FBN1* Analyse bei Patienten mit MFS

Eine genaue klinische Evaluation nach den Kriterien der Genter Nosologie bildet damit weiterhin den Grundstein in der Diagnosefindung des MFS. Die molekulare Diagnose repräsentiert höchstens einen Zusatz zur klinischen Evaluation, denn die Identifikation einer *FBN1* Mutation impliziert nicht notwendigerweise die Diagnose eines MFS. Andererseits kann die Diagnose eines MFS nicht ausgeschlossen werden, wenn eine Mutation nicht gefunden wurde, da die Mutations Detektionsrate insgesamt, auch beim „klassischen“ MFS weniger als 100% beträgt.

*FBN1*-Mutationen wurden zudem auch bei Patienten mit anderen Erkrankungen beschrieben. Eine de novo *FBN1*-Mutation (p.C1223Y) wurde bei einem Patienten mit sporadischem Shprintzen-Goldberg-Syndrom (SGS) gefunden, der auch die typischen skeletalen, okulären und kardiovaskulären Merkmale des MFS zeigte (Sood 1996). Ein

zweiter Basenaustausch (p.P1148A) der erst als Mutation beschrieben wurde (Sood 1996), stellte sich später eher als Polymorphismus-Variante denn als krankheitsverursachende Mutation heraus (Wang 1997). Wir haben die gesamte codierende Sequenz des *FBN1*-Gens bei zwei Patienten mit SGS untersucht, fanden aber keinen Hinweis auf eine Mutation. Loeys et al. (2001) fanden ebenfalls keine Mutation bei drei Kindern mit SGS. Damit bleibt unklar, ob es überhaupt eine Assoziation zwischen *FBN1* Mutationen und dem SGS gibt. Somit schlussfolgern wir, dass Mutationen im *FBN1* eher in seltenen Fällen eine Ursache für das SGS darstellen.

Eine Prädisposition für ein isoliertes Aortenaneurysma kann über einen autosomal dominanten Vererbungsmodus weitergegeben werden. Jedoch zeigten sich in diesen Familien selten *FBN1*-Mutationen, die mit dem Phänotyp isolierter Aortenaneurysmata kosegregierten (Franke 1995/ Körkkö 2002/Milewicz 1996). Wir fanden bei dem Patienten B60 (siehe 4.1.2.3) mit einem isolierten Aortenaneurysma eine Mutation in Exon 21. Einige der beschriebenen Patienten zeigten auch Nebenkriterien des skletalen oder okulären Systems. *FBN1*-Mutationen scheinen damit eine seltene Ursache für isolierte Aortenaneurysmen ohne weitere MFS-Merkmale zu sein und die Mutationsanalyse hat *FBN1*-Mutationen nur in einer Minderheit der getesteten Patienten gezeigt (Körkkö 2002, diese Studie). Zwei weitere Loci für das autosomal dominant vererbte Aortenaneurysma (TAA) wurde auf Chromosom 11q23.2-q24 (Vaughan 2001) und auf 5q13-14 (Guo 2001) entdeckt. Andere Familien zeigten wiederum zu keinem dieser Orte oder zum *FBN1* eine Kopplung, sodaß die Existenz eines weiteren Ortes für TAA wahrscheinlich erscheint (Guo 2001). Auch wenn neuere große Studien Verbesserungen in der Fähigkeit der Mutationsdetektion bei Patienten mit „klassischem“ MFS zeigten, wird die Mutationsanalyse ein schwieriges Unterfangen bleiben. In prospektiven Studien konnten *FBN1* Mutationen nicht in einer ausschlaggebenden Anzahl von klar diagnostizierten MFS Patienten gefunden werden. Die Mutations-Detektionsrate für *FBN1*-Mutationen fällt dramatisch bei getesteten Patienten, die die Kriterien der Genter Nosologie nicht erfüllen (De Paepe 1996).

## 6. Zusammenfassung

Das Marfan-Syndrom (MFS) ist eine autosomal dominant vererbte Erkrankung des Bindegewebes, die durch Mutationen im Fibrillin-1 Gen (*FBN1*) hervorgerufen wird. Die Manifestationen zeigen sich v.a. im skelettalen, okulären und kardiovaskulären System. Kennzeichnend für die Erkrankung ist eine hohe klinische intra- und interfamiliäre Variabilität der Symptome mit einer variablen Penetranz. Die Haupttodesursache, durch die sich eine deutlich reduzierte Lebenserwartung bei unbehandelten Patienten ergibt, ist die Aortendissektion, die als Folge einer progredienten Dilatation der Aortenwurzel auftreten kann. Das *FBN1*-Gen liegt auf Chromosom 15q21.1, setzt sich aus 65 Exonen zusammen und kodiert für das Protein Fibrillin-1. Fibrillin-1 ist Bestandteil der extrazellulären Matrix und beteiligt sich u.a. am Aufbau elastischer Fasern. Zum Zeitpunkt der Studie waren über 300 Mutationen, die in einer online Datenbank geführt werden, bekannt. Diese Mutationen verteilen sich über das gesamte Gen. Das Verständnis der Erkrankung und seiner Pathogenese ist eng mit der Suche nach Genotyp-Phänotyp-Korrelationen verknüpft. *FBN1*-Mutationen wurden bisher nicht nur bei Patienten mit „klassischem“ MFS gefunden, sondern zeigten sich auch bei einer Reihe weiterer verwandter Bindegewebserkrankungen, die zusammenfassend als Typ-1-Fibrillinopathien bezeichnet werden.

In der vorliegenden Arbeit wurden in einer Screeninggruppe von 126 Patienten mit MFS, anderen Typ-1 Fibrillinopathien und verwandten Erkrankungen des Bindegewebes, die Exone 1-58 des *FBN1* mit Hilfe der Temperatur-Gradienten-Gelelektrophorese (TGGE) auf Mutationen hin untersucht. Insgesamt wurden 45 Mutationen gefunden, von denen 41 erstmals beschrieben wurden. Alle Mutationen zeigten jeweils bei den betroffenen Individuen in der TGGE ein charakteristisches Bandenmuster, das bei keinem anderen Mitglied der Screeninggruppe gefunden wurde. Einige Mutationen wurden bei Individuen mit Typ-1-Fibrillinopathien gefunden, die nicht die Diagnosekriterien des „klassischen“ MFS erfüllten, wie beispielsweise Aneurysma der Aorta ascendens mit nur leichten skelettalen Symptomen, oder alleinige Manifestationen im okulären oder skelettalen System. Auf der Grundlage der gefundenen Mutationen, im Vergleich zu bereits veröffentlichten Mutationen in der Literatur, erfolgte die Analyse in Bezug auf mögliche Genotyp-Phänotyp-Korrelationen.

Die Mehrheit der bisher bekannten Mutationen ist für den jeweiligen Patienten, bzw. die Familie spezifisch und zeigt dabei zusätzlich noch eine hohe inter- und intrafamiliäre

Variabilität der resultierenden Phänotypen. So können Träger der identischen Mutation eine weite Variation des klinischen Status zeigen, v.a. in Bezug auf den Zeitpunkt und die Schwere der klinischen Manifestation und das betreffende Organsystem. Die allelische Mutation scheint damit nicht die einzige Determinante für das resultierende klinische Bild zu sein. Dennoch können, zumindest für einen Teil der Mutationen, aus den erhobenen Daten Genotyp-Phänotyp-Korrelationen angenommen werden. In der Mitte des Gens, in den Exonen 24-32, zeigt sich vor allem für das neonatale MFS (nMFS), einer besonders schwerwiegenden Variante der Erkrankung, die oft schon innerhalb der ersten 12 Monate tödlich verläuft, eine klare Häufung an Mutationen. Alle bisher gefundenen Mutationen bei Patienten mit nMFS befinden sich in dieser Region. Es zeigte sich eine Häufung von hauptsächlich Missense Mutationen in den Exonen 24-28 und ein vermehrtes Auftreten von Mutationen mit Exon-Skipping in den Exonen 31-32. Diese Genregion wird daher auch gerne als „neonatale Region“ bezeichnet. Aber auch Patienten mit klassischem MFS, atypisch schwerem MFS oder verwandten Fibrillinopathien zeigten in diesem Bereich, wenn auch nur grenzwertig signifikant, eine Häufung von Mutationen. Es ist daher nicht möglich bei einer Mutation in dieser Region von einer schwerwiegenden klinischen Manifestation auszugehen. Mutationen im Bereich der 5`-Region zeigten in der Mehrzahl der Fälle milde Phänotypen, mit dem Fehlen kardiovaskulärer Symptome oder allenfalls mit einer sehr milden kardiovaskulären Beteiligung. Ähnliches gilt für Mutationen im Bereich der 3`-Region des Gens. Die Mutationsdetektionsrate der gesamten Studie betrug 42%. In der Gruppe der Patienten mit „klassischem“ MFS lag sie bei 51%. Patienten, die die Kriterien der Genter Nosologie nicht erfüllten, zeigten eine Mutationsdetektionsrate von nur 12%. Vergleicht man die bisher veröffentlichten Studien, fällt eine insgesamt niedrige Mutationsdetektionsrate auf, die sich nur in den Gruppen der Patienten mit gesicherten MFS erhöht. Warum nur bei einem Teil der Patienten eine Mutation nachgewiesen werden konnte und die allgemeine Mutationsdetektionsrate so niedrig ist, bleibt unklar. Zwar könnten sich z.B. größere Mutationen, wie multiexonische Deletionen den etablierten Detektionsmethoden entziehen oder auch ein weiterer Genort könnte für die geringe Rate verantwortlich sein, am wahrscheinlichsten erscheint jedoch weniger die Methode, als vielmehr eine klinische Überdiagnostik zu einer verminderten Mutationsdetektionsrate zu führen, denn bei ca. der Hälfte der Patienten, die sich mit der Verdachtsdiagnose MFS in Spezialprechstunden vorstellen, wird diese nicht bestätigt.

## 7. Literaturverzeichnis

- Adès LC, Morris LL, Power RG et al. Distinct skeletal abnormalities in four girls with Shprintzen-Goldberg syndrome. *Am J Med Genet* 1995; 75:565-572
- Adès LC, Sreetharan D, Onikul E, et al. Segregation of a Novel *FBN1* Gene Mutation, G1796E, With Kyphoscoliosis and Radiographic Evidence of Vertebral Dysplasia in Three Generations, *Am J Med Genet* 2002;109:261-270
- Adès LC, Holman KJ, Brett MS, Edwards MJ, Bennetts B. Ectopia Lentis Phenotypes and the *FBN1* Gene, *Am J Med Genet* 2003;126A:284-2
- Adès LC, Sullivan K, Biggin A et al. *FBN1*, *TGFBR1*, and the Marfan-craniosynostosis/mental retardation disorders revisited, *Am J Med Genet* 2006; 140(10):1047-58.
- Akhurst RJ. TGF beta signaling in health and disease. *Nat Genet* 2004;36(8):790-2.
- Annes JP, Munger SJ and Rifkin DB. Making sense of latent TGFb activation. *J Cell Sci* 2003;116, 217-224
- Aoyama T, Francke U, Dietz HC, Furthmayr H. Quantitative differences in biosynthesis and extracellular deposition of fibrillin in cultured fibroblasts distinguish five groups of Marfan syndrome patients and suggest distinct pathogenetic mechanisms. *J Clin Invest* 1994;94: 130-7
- Ashworth JL, Murphy G, Rock MJ et al. Fibrillin degradation by matrix metalloproteinases: implications for connective tissue remodelling. *Biochem J* 1994;340: 171-181
- Beals RK, Hecht F. Congenital contractural arachnodactyly: A heritable disorder of connective tissue. *J Bone Joint Surg* 1971;53A: 987-993.
- Beighton P, de Paepe A, Danks D et al. International nosology of heritable disorders of connective tissue, Berlin 1986 *Am J Med Genet* 1988;29: 581-594
- Berget SM (1995) Exon Recognition in Vertebrate Splicing, *J Biol Chem* 270(6): 2411-4
- Biery JN, Eldadah ZA, Moore CS, Stetten G, Spencer F, Dietz HC. Revised Genomic Organization of *FBN1* and Significance for Regulated Gene Expression 1999; 56: 70-77
- Black C, Withers AP, Gray JR et al. Correlation of a Recurrent *FBN1* Mutation (R122C) With an Atypical Familial Marfan Syndrome Phenotype, *Hum Mut Supp* 1998; 1:198-20
- Blyth M, Foulds N, Turner C, Bunyan D. Severe Marfan syndrome due to *FBN1* exon deletions. *Am J Med Genet Part A* 2008;146A:1320-1324.
- Boileau C, Jondeau G, Babron MC et al. Autosomal dominant Marfan-like connective tissue disorder with aortic dilatation and skeletal anomalies not linked to the fibrillin genes. *Am J Hum Genet* 1993;53:46-54
- Booms P, Withers AP, Boxer M et al. A novel *de novo* mutation in exon 14 of the fibrillin-1 gene associated with delayed secretion of fibrillin in a patient with a mild Marfan phenotype, *Hum Genet* 1997;100: 195-200

- Booms P, Cisler J, Mathews KR et al. Novel exon skipping mutation in the fibrillin-1 gene: Two „hot spots“ for the neonatal Marfan Syndrome 1999; 55:110-117
- Booms P, Tiecke F, Rosenberg T, Hagemeyer C, Robinson PN. Differential effect of *FBN1* Mutations on in vitro proteolysis of recombinant fibrillin-1 fragments Hum Genet 2000;107:216-224
- Booms P, Pregla R, Ney A et al. RGD-containing fibrillin-1 fragments upregulate matrix metalloproteinase expression in cell culture: A potential factor in the pathogenesis of the Marfan syndrome, Hum Genet 2005;116: 51-61
- Booms P, Ney A, Barthel F, Gautier M et al. A fibrillin-1-fragment containing the elastin-binding-protein GxxPG consensus sequence upregulates matrix metalloproteinase-1: biochemical and computational analysis. J Med Cell Cardiol 2006;40:234-46.
- Bresters D, Nikkels PGJ, Meijboom EJM et al. Clinical pathological and molecular genetic findings in a case of neonatal Marfan syndrome, Acta Paediatr 1999;88: 98-101
- Brooke BS, Habashi JP, Judge DP et al. Angiotensin II Blockade and Aortic-Root Dilation in Marfan's Syndrome. N Engl J Med 2008;358:2787-95.
- Cardy CM, Handford PA. Metal ion dependency of microfibrils supports a rod-like conformation for fibrillin-1 calcium-binding epidermal growth factor-like domains. J Mol Biol 1998;276:855-860
- Carrel T. Kardiovaskuläre Chirurgie beim Marfan-Syndrom. Schweiz Med Wochenschr 1997;127:992-1006
- Cistulli PA, Sullivan CE. Sleep-disordered breathing in Marfan's syndrome. Am Rev Respir Dis 1993;147: 645-648
- Collod G, Babron MC, Jondeau G et al. A second locus for Marfan syndrome maps to chromosome 3p24.2-p25. Nat Genet 1994;8:264-268
- Collod-Bérout G, Bérout C, Ades L et al. Marfan Database (third edition): new mutations and new routines for the software. Nucleic Acids Res 1998;26:223-229
- Collod-Bérout G, Le Bourdelles S, Ades L et al. Update of the UMD-FBN1 mutation database and creation of an FBN1 polymorphism database. Hum Mutat. 2003;22(3):199-208.
- Comeglio P, Evans AL, Brice GW et al. Identification of FBN1 gene mutations in patients with ectopia lentis and marfanoid habitus. Br J Ophthalmol 2002;86:1359-62
- Corson GM, Charbonneau NL, Keene DR, Sakai LY. Differential expression of fibrillin-3 adds to microfibril variety in human and avian, but not rodent, connective tissues. Genomics 2004;83:461-472
- Costes B, Girodon E, Ghanem N et al. Psoralen-modified oligonucleotide primers improve detection of mutations by denaturing gradient gel electrophoresis and provide an alternative to GC-clamping. Hum Mol Genet 1993;2: 393-397
- Curci J, Liao S, Huffmann M, Shapiro S, Thompson R. Expression and Localization of Macrophage Elastase (MMP-12) in Abdominal Aortic Aneurysms. J Clin Invest 1998;102:1900-1910 (a)

- Cruci J, Petrincec D, Liao S, Golub L, Thompson R. Pharmacologic suppression of experimental abdominal aortic aneurysms: A comparison of doxycycline and four chemically modified tetracyclines. *J Vasc Surg* 1998;28:1082-1093 (b)
- D'Arrigo C, Burl S, Withers AP et al. TGF- $\beta$ 1-binding protein-like modules of fibrillin-1 und -2 mediate integrin-dependent cell adhesion. *Connect Tissue Res* 1998;37:29-51
- De Paepe A, Devereux RB, Dietz HC, Hennekam RC, Pyeritz RE. Revised diagnostic criteria for the Marfan Syndrome. *Am J Med Genet* 1996;62:417-426
- Dietz HC, Cutting GR, Pyeritz RE et al. Marfan Syndrome caused by a recurrent de novo missense mutation in the fibrillin gene. *Nature* 1991;352:337-339.
- Dietz HC, McIntosh I, Sakai LY et al. Four novel FBN1 mutations: Significance for mutant transcript level and EGF-like domain calcium binding in the pathogenesis of Marfan syndrome. *Genomics* 1993;17:468-475
- Downing AK, Knott V, Werner JM et al. Solution structure of a pair of calcium-binding epidermal growth factor-like domains: implications for the Marfan syndrome and other genetic disorders. *Cell* 1994;85:597-605
- Eldadah ZA, Brenn T, Furthmayr H, Dietz HC. Expression of a mutant human fibrillin allele upon a normal human or murine genetic background recapitulates a Marfan cellular phenotype. *J Clin Invest* 1995;95:874-80
- Faivre L. In frame fibrillin-1 gene deletion in autosomal Weill-Marchesani syndrome. *J Med Genet* 2003;40:34-36
- Faivre L, Collod-Beroud G, Loeys B et al. Effect of Mutation Type and Location on Clinical Outcome in 1,013 Probands with Marfan Syndrome or Related Phenotypes and *FBN1* Mutations: An International Study. *Am J Hum Genet*. 2007;81(3):454-66
- Fodde R, Losekoot M. Mutation detection by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). *Hum Mut* 1994;3:83-94
- Franke U, Berg MA, Tynan K et al. A Gly1127Ser mutation in an EGF-like domain of the fibrillin-1 gene is a risk factor ascending aortic aneurysm and dissection. *Am J Hum Genet* 1995;56: 1287-1296
- Furthmayr H, Francke U. Ascending aortic aneurysm with or without features of Marfan syndrome and other fibrillinopathies: new insights. *Sem Thorac Cardiovasc Surg* 1997;9: 191-205
- Gille C, Gille A, Booms P, Robinson PN, Nurnberg P. Bipolar clamping improves the sensitivity of mutation detection by temperature gradient gel electrophoresis. *Electrophoresis*. 1998;19:1347-1350
- Glanville RW, Quian RQ, McClure DW, Maslen CL. Calcium binding, hydroxylation, and glycosylation of the precursor epidermal growth factor-like domains of fibrillin-1, the Marfan gene protein. *J Biol Chem* 1994;269:26630-4
- Godfrey M, Raghunath M, Cisler J et al. Abnormal morphology of fibrillin microfibrils in fibroblast cultures from patients with neonatal Marfan syndrome. *Am J Hum Genet* 1995;146:1414-21.
- Gray JR, Bridges AB, Faed MJ et al. Ascertainment and severity of Marfan syndrome in a Scottish population *J Med Genet* 1994;31: 51-4

- Grompe M. The rapid detection of unknown mutations in nucleic acids. *Nat Genet* 1993;5:111-117
- Guo D, Hasham S, Kuang SQ et al. Familial thoracic aortic aneurysms and dissections: genetic heterogeneity with a major locus mapping to 5q13-14. *Circulation* 2001;103:2461-2468
- Guo G, Booms P, Halushka M et al. Induction of Macrophage Chemotaxis by Aortic Extracts of the mgR Marfan Mouse Model and a GxxPG-Containing Fibrillin-1 Fragment. *Circulation* 2006;114:1855-1862.
- Gupta PA, Putnam EA, Carmical SG et al. Ten novel FBN2 mutations in congenital contractural arachnodactyly: delineation of the molecular pathogenesis and clinical phenotype. *Hum Mutat* 2002; 19: 39-48
- Habashi J, Judge D, Holm T et al. Losartan, an AT1 Antagonist, Prevents Aortic Aneurysm in a Mouse Model of Marfan syndrome. *Science* 2006; 312, 117-21
- Hall J, Pyeritz RE, Dudgeon DL, Haller JA. Pneumothorax in the Marfan syndrome: Prevalence and therapy. *Ann Thrac Surg* 1984; 37:500-504
- Halliday D, Hutchinson S, Kettle S et al. Molecular analysis of eight mutations in FBN1. *Hum Genet* 1999; 105: 587-597
- Handford PA, Mayhew M, Baron M et al. Key residues involved in calcium-binding motifs in EGF-like domains. *Nature* 1991; 351: 164-7
- Hayward C, Porteous ME, BrockDJ. A novel mutation in the fibrillin gene (FBN1) in familial arachnodactyly. *Mol Cell Probes* 1994; 8:325-327
- Hayward C, Porteous ME, BrockDJ. Mutation screening of all 65 exons of the fibrillin-1 gene in 60 patients with Marfan synddrome: report of 12 novel mutations. *Hum Mutat* 1997; 10:280-289
- Herskowitz I. Functional inactivation of genes by dominant negative mutations. *Nature* 1987; 329: 219-22
- Hewett DR, et al. Differential allelic expression of a fibrillin gene (FBN1) in patients with Marfan syndrome. *Am J Hum Genet* 1994; 52:447-452
- Hurle JM, Kitten GT, Sakai LY, Volpin D, Solursh M. Elastic extracellular matrix of the embryonic chick heart: an immunohistological study using laser confocal microscopy. *Dev Dyn* 1994; 200:321-332
- Hynes RO. Integrins: versatility, modulation and signaling in cell adhesion. *Cell* 1992; 69:11-25
- Ikebuchi M, Yamamoto T, Chikumi H et al. The Arg1075His substitution in the FBN1 gene is clinically innocent for Marfan syndrome. *Online. Hum Mutat* 2000;15:298
- Jacobs AM, Toudjarska I, Racine A et al. A recurring FBN 1 gene mutation in neonatal Marfan syndrome. *Arch Pediatr Adolesc Med* 2002; 156:1081-5
- Judge DP, Biery NJ, Keene DR et al. Evidence for a critical contribution of haploinsufficiency in the complex pathogenesis of Marfan syndrome. *J Clin Invest* 2004; 114:172-181
- Kaartinen V, Warburton D. Fibrillin controls TGF- $\beta$  activation. *Nature Genetics* 2003; 33: 331-332

- Kainulainen K, Pulkkinen L, Savolainen A, Kaitila I, Peltonen L. Location on chromosome 15 of the gene causing Marfan syndrome. *N Engl J Med* 1990; 323:935-39
- Kainulainen K, Sakai LY, Child A et al. Two mutations in Marfan syndrome resulting in truncated fibrillin polypeptides. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89:5917-5921
- Kainulainen K, Karttunen L, Puhakka L, Sakai LY, Peltonen L. Mutations in the fibrillin gene responsible for dominant ectopia lentis and neonatal Marfan syndrome. *Nat Genet* 1994; 6:64-69.
- Katzke S, Booms P, Tiecke F et al. TGGE screening of the entire FBN1 coding sequence in 126 individuals with marfan syndrome and related fibrillinopathies. *Hum Mutat* 2002; 20:197-208
- Kielty CM, Shuttleworth CA. The role of calcium in the organization of fibrillin microfibrils. *FEBS Lett* 1993; 336:323-6
- Kielty CM, Woolley DE, Whittaker SP, Shuttleworth CA. Catabolism of intact fibrillin microfibrils by neutrophil elastase, chymotrypsin and trypsin. *FEBS Lett* 1994; 351: 85-9
- Knott V, Downing AK, Cardy CM, Handford P. Calcium binding properties of an epidermal growth factor-like domain pair from human fibrillin-1 *J Mol Biol* 1996; 255:22-27
- Kodolitsch v. Y, Raghunath M, Nienaber CA. Das Marfan-Syndrom: Prävalenz und natürlicher Verlauf der kardiovaskulären Manifestationen *Z Kardiol* 1998; 87:150-160 (a)
- Kodolitsch v. Y, Raghunath M, Dieckmann C, Nienaber CA. Das Marfan-Syndrom: Diagnostik der kardiovaskulären Manifestationen. *Z Kardiol* 1998; 87:161-172 (b)
- Kodolitsch v. Y, Raghunath M, Karck M, Haverich A, Nienaber CA. Das Marfan-Syndrom: Therapie bei kardiovaskulären Manifestationen. *Z Kardiol* 1998; 87:173-184 (c)
- Körkkö J, Kaitila I, Lönnqvist L, Peltonen L, Ala-Kokko L. Sensitivity of conformation sensitive gel electrophoresis in detecting mutations in Marfan syndrome and related conditions. *J Med Genet* 2002; 39:34-41
- Lacro RV, Dietz HC, Wruck LM et al. Pediatric Heart Network Investigators Rationale and design of a randomized clinical trial of beta-blocker therapy (atenolol) versus angiotensin II receptor blocker therapy (losartan) in individuals with Marfan syndrome. *Am Heart J* 2007, 154:624-31.
- Lerman LS, Silverstein K. Computational simulation of DNA melting and its application to denaturing gradient gel electrophoresis. *Methods Enzymol* 1987; 155:482-501
- Lipscomb KJ, Clayton-Smith J, Harris R. Evolving phenotype of Marfan's syndrome. *Arch.Dis. Child* 1997; 7: 41-46
- Liu W, Qian C, Comeau T et al. Mutant fibrillin-1 monomers lacking EGF-like domains disrupt microfibril assembly and cause severe Marfan syndrome. *Hum Mol Genet* 1996;5:1581-1587

- Liu W, Oefner PJ, Qian C, Odom RS, Franke U. Denaturing HPLC-identified novel FBN1 mutations, polymorphisms, and sequence variants in Marfan syndrome and related connective tissue disorders. *Genet Test* 1998; 1:237-242
- Liu W, Schrijver I, Brenn T, Furthmayr H, Francke U. Multiexon deletions of the FBN1 gene in Marfan syndrome. *BMC Med Genet* 2001; 2:11
- Lo IF, Wong RM, Lam FW, Tong TM, Lam ST. Missense mutations of the fibrillin-1 gene in two chinese patients with severe Marfan syndrome. *Chin Med J* 2001; 114(5):473-6.
- Lönnquist L, Child A, Kainulainen K, Davidson R, Puhakka L, Peltonen L. A Novel Mutation of the Fibrillin Gene Causing Ektopia Lentis. *Genomics* 1993; 19: 573-576
- Lönnquist L, Karttunen L, Rantamäki T, Kielty C, Raghunath M, Peltonen L. A Point Mutation Creating an Extra N-Glycosylation Site in Fibrillin-1 Results in Neonatal Marfan Syndrome. *Genomics* 1996; 36: 468-475
- Loeys B, Nuytinck L, Delvaux I, De Bie S, De Paepe A. Genotype and phenotype analysis of 171 patients referred for molecular study of the fibrillin-1 gene FBN1 because of suspected Marfan syndrome. *Arch Intern Med* 2001;161: 2447-2454
- Loeys BL, Chen J, Neptune ER et al. A syndrome of altered cardiovascular, craniofacial, neurocognitive and skeletal development caused by mutations in TGFBR1 or TGFBR2. *Nat Genet.* 2005; 37(3):275-81.
- Loeys BL, Schwarze U, Holm T et al. Aneurysm syndromes caused by mutations in the TGF-beta receptor. *New Eng. J. Med.* 2006; 355: 788-798.
- Macek M Jr, Mercier B. Sensitivity of the denaturing gradient gel electrophoresis technique in detection of known mutations and novel Asian mutations in the CFTR gene. *Hum Mutat* 1997; 9(2): 136-147
- Marfan AB. 1896. Un cas de déformation congénitale des quatre membres plus prononcée aux extrémités caractérisée par l'allongement des os avec un certain degré d'amincissement. *Bull. Mém. Soc. Med. Hop. Paris (Ser. 3)* 1896; 13:220-26.
- Matsukawa R, Kazuki I, Nakayama M et al. Eight Novel Mutations of the *FBN1* Gene Found in Japanese Patients With Marfan Syndrome. *Hum Mutat* 2001; 17:71-2
- Mátyás G, Arnold E, Carrel T et al. Identification and in silico analyses of novel TGFBR1 and TGFBR2 mutations in Marfan Syndrome-related disorders. *Hum Mutat.* 2006; 27(8):760-9.
- Mátyás G, Alonso S, Patrignani A et al. Large genomic fibrillin-1 (*FBN1*) gene deletions provide evidence for true haploinsufficiency in Marfan syndrome. *Hum Genet.* 2007; 122:23-32.
- Maumenee IH. The eye in the Marfan syndrome. *Trans Am Ophthalmol Soc* 1981; 79:684-733
- McGettrick AJ, Knott V, Willis A, Handfort PA. Molecular effects of calcium binding mutations in Marfan syndrome depend on domain context. *Hum Mol Gene* 2000; 9:1987-1994
- McGookey D and Milewicz D. Molecular genetics of Marfan syndrome and Ehlers-Danlos type IV. *Curr Opin Cardiol* 1998; 13:198-204

- Milewicz D, Pyeritz RE, Crawford ES, Byers PH. Marfan syndrome: defective synthesis, secretion, and extracellular matrix formation of fibrillin by cultured dermal fibroblasts. *J Clin Invest* 1992; 89:79-86
- Milewicz D, Duvic M. Severe Neonatal Marfan Syndrome Resulting from a De Novo 3-bp Insertion in the Fibrillin Gene on Chromosome 15. *Am J Hum Genet.* 1994; 54:447-453
- Milewicz D, Grossfield J, Shi-Nian C, Kielty C, Covitz W, Jewett T. A Mutation in FBN1 Disrupts Profibrillin Processing and Results in Isolated Skeletal Features of the Marfan Syndrome. *J Clin Invest* 1995; 95:2373-2378
- Milewicz D, Michael K, Fisher N, Coselli JS, Markello T, Biddinger A. Fibrillin-1 (FBN1) Mutations in Patients With Thoracic Aortic Aneurysms. *Circulation* 1996; 94:2708-2711
- Mizuguchi T, Collod-Beroud G, Akiyama T et al. Heterozygous TGFBR2 mutations in Marfan syndrome. *Nat Genet* 2004; 36: 855-860
- Murdoch JL, Walker BA, Halpern BL et al. Life expectancy and causes of death in the Marfan syndrome. *N Engl J Med* 1972; 286:804-808 (a)
- Murdoch JL, Walker BA, McKusick VA. Paternal age effects on the occurrence of new mutations in the Marfan syndrome. *Ann Hum Genet* 1972; 35:331-336 (b)
- Neptune ER, Frischmeyer PA, Arking D et al. Dysregulation of TGF-beta activation contributes to pathogenesis in Marfan syndrome. *Nat Genet.* 2003; 33:407-11.
- Nijbroek G, Sood S, McIntosh I et al. Fifteen Novel FBN1 Mutations Causing Marfan Syndrome Detected by Heteroduplex Analysis of Genomic Amplicons. 1995. *Am J Hum Genet* 1995; 57: 8-21
- Palz M, Tiecke F, Booms P et al. Clustering of mutations associated with mild Marfan-like phenotypes in the 3' region of FBN1 suggests a potential genotype-phenotype correlation. *Am J Med Genet* 2000; 91(3):212-21
- Pereira L, D'Alessio M, Ramirez F et al. Genomic organization of the sequence coding for fibrillin, the defective gene product in Marfan syndrome. *Hum Mol Genet* 1993; 2:961-968
- Pereira L, Levran O, Ramirez F et al. A Molecular Approach To The Stratification Of Cardiovascular Risk In Families With Marfan Syndrome. *NEJM* 1994; 331:148-153
- Pereira L, Andrikopoulos K, Tian J et al. Targetting of the gene encoding fibrillin-1 recapitulates the vascular aspect of Marfan syndrome. *Nat Genet* 1997; 17: 218-22
- Park ES, Putnam EA, Chitayat D, Child A, Milewicz DM. Clustering of FBN2 Mutations in Patients With Congenital Contractural Arachnodactyly Indicates an Important Role of the Domains Encoded by Exons 24 Through 34 During Human Development. *Am J Med Genet* 1998; 78:350-355
- Putnam EA, Zhang H, Ramirez F, Milewicz DM. Fibrillin-2 (FBN2) mutations result in the Marfan-like disorder, congenital contractural arachnodactyly. *Nature Genet* 1995; 11:456-458
- Putnam EA, Cho M, Zinn AB, Towbin JA, Byers PH, Milewicz DM. Delineation of the Marfan phenotype associated with mutations in exons 23-32 of the FBN1 gene. *Am J Med Genet* 1996; 62:2333-42

- Pyeritz RE. The Marfan-syndrome, *Annu Rev Med* 2000; 51: 481-510
- Ramirez F, Gayraud B, Pereira L. Marfan syndrome: new clues to genotype-phenotype correlations. *Ann Med* 1999; 31: 202-207
- Raghunath M, Kielty CM, Steinmann B. Truncated profibrillin of a Marfan patient is of apparent similar size as fibrillin: intracellular retention leads to over-N-glycosylation. *J Mol Biol.* 1995; 248:901-909
- Rao Z, Handford P, Mayhew M, Knott V, Browniee GG, Stuart D. The Structure of a Ca<sup>2+</sup>-Binding Epidermal Growth Factor-like Domain: Its Role in Protein-Protein Interactions. *Cell* 1995; 82:131-141
- Reinhardt DP, Ono RN, Sakai LY. Calcium Stabilizes Fibrillin-1 against Proteolytic Degradation. *J Biol Chem* 1997; 272:1231-1236
- Reinhardt DP, Ono RN, Notbohm H, Müller PK, Bächinger HP, Sakai LY. Mutations in Calcium-binding Epidermal Growth Factor Modules Render Fibrillin-1 Susceptible to Proteolysis. *J Biol Chem* 2000; 275: 12339-12345
- Riesner D, Steger G, Zimmat R et al. Temperature-gradient gel electrophoresis of nucleic acids: analysis of conformational transitions, sequence variations, and protein-nucleic acid interactions. *Electrophoresis* 1989; 10:377-389.
- Robinson PN, Booms P. The molecular pathogenesis of the Marfan syndorme. *CMLS, Cell Mol Life Sci* 2001; 58:1698-1707
- Robinson PN, Booms P, Katzke S et al. Mutations of FBN1 and Genotype-Phenotype Correlations in Marfan Syndrome and Related Fibrillinopathies. *Hum Mut* 2002; 20:153-161
- Robinson PN, Godfrey M. The molecular genetics of Marfan syndrome and related fibrillinopathies. *J Med Genet* 2000; 37: 9-25
- Robinson PN, Neumann LM, Demuth S et al. Shprintzen-Goldberg syndrome: fourteen new patients and a clinical analysis. *Am J Med Genet* 2005;135(3):251-62.
- Roman MJ, Rosen SE, Kramer-Fox R, Devereux RB. Prognostic significance of the pattern of aortic root dilatation in the Marfan syndrome *J Am Coll Cardiol* 1993; 22:1470-1476
- Rybczynski M, Bernhardt AM, Rehder U et al. The spectrum of syndromes and manifestations in individuals screened for suspected Marfan syndrome. *Am J Med Genet* 2008; 146A(24):3157-66.
- Sakamoto H, Broekelmann T, Cheresh DA, Ramirez F, Rosenbloom J, Mecham RP. Cell-type Specific Recognition of RGD- an Non-RGD-containing Cell Binding Domains in Fibrillin-1. *J Bio Chem* 1996; 271:4916-4922
- Sakai LY, Keene DR, Engvall E. Fibrillin, A new 350-kD Glycoprotein, Is a Component of Extracellular Microfibrils. *J Cell Bio* 1986; 103: 2599-2509
- Sakai LY, Keene DR, Glanville RW, Bächinger HP. Purification and Partial Characterization of Fibrillin, a Cystein-rich Structural Component of Connective Tissue Microfibrils. *J Bio Chem* 1991; 266: 14763-12770
- Sanger F., Nicklen S., Coulson R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Biochemistry* 1977;74, 5463-7

- Schrijver I, Liu W, Brenn T, Furthmayr H, Francke U. Cysteine Substitutions in Epidermal Growth Factor-Like Domains of Fibrillin-1: Distinct Effects on Biochemical and Clinical Phenotypes. *Am J Hum Genet* 1999; 65:1007-1020
- Schrijver I, Liu W, Odom R et al. Premature Termination Mutations in FBN1: Distinct Effects on Differential Allelic Expression and on Protein and Clinical Phenotypes. *Am J Hum Genet* 2002; 71:223-227
- Schwartz DC, Cantor CR (1984) Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. *Cell* 37:67-75
- Segura AM, Luna RE, Hriba K et al. Immunohistochemistry of matrix metalloproteinases and their inhibitors in thoracic aortic aneurysms and aortic valves of patients with Marfan's syndrome. *Circulation* 1998; 98:II331-7; discussion II337-8
- Selander-Sunnerhagen M, Ullner M, Persson E, Telemann O, Stenflo J, Drakenberg T. How a Epidermal Growth Factor (EGF)-like Domain Binds Calcium. *J Bio Chem* 1992; 267:19642-19649
- Shores J, Berger KR, Murphy EA, Pyeritz RE. Progression of Aortic Dilatation and the Benefit of Long-Term  $\beta$ -Adrenergic Blockade in Marfan's Syndrome. *NEJM* 1994; 30:1335-1341
- Shprintzen RJ, Goldberg RB. A recurrent pattern syndrome of craniosynostosis associated with arachnodactyly and abdominal hernias. *J Craniofac Genet Dev Biol* 1982, 2:65-74
- Silverman DI, Burton KJ, Gray J. Live expectancy in the Marfan syndrome. *Am J Cardiol* 1995; 75:157- 60.
- Smallridge RS, Whitemann P, Doering K, Handford PA, Downing AK. EGF-like domain calcium affinity modulated by N-terminal domain linkage in human fibrillin-1. *J Mol Biol* 1999; 286:661-8
- Sood S, Eldadah ZA, Krause WL, McIntisg I, Dietz HC. Mutation in fibrillin-1 and the marfanoid-craniosynostosis (Shprintzen-Goldberg) syndrome. *Nature genetics* 1996; 12:209-211
- Southern EM. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Bio* 1975, 98:503-517
- Sponseller PD, Hobbs W, Riley LH, Pyeritz RE. The Thoracolumbar Spine in Marfan Syndrome. *Journal of Bone and Joint Surgery* 1995, 77: 867-876
- Stahl-Hallengren C, Ukkonen T, Kainulainen K et al. An Extra Cysteine in One of the Non-calcium-binding Epidermal Growth Factor-like Motifs of the FBN1 Polypeptide Is Connected to a Novel Variant of Marfan Syndrome. *J Clin Invest* 1994; 94:709.713
- Tiecke F, Katzke S, Booms P. Classic, atypically severe and neonatal Marfan syndrome: twelve mutations and genotype-phenotype correlations in FBN1 exons 24-40. *Euro J Hum Genet* 2001; 9: 13-21
- Tilsra DJ, Byers PH. A novel mutation in a non calcium binding EGF precursor-like motif in a family with Marfan syndrome. *Scientific Workshop of the Marfan syndrome, Oregon Abstract* (1993).

- Tynan K, Comeau K, Pearson M et al. Mutation screening of complete fibrillin-1 coding sequence: report of five new mutations, including two in 8-cysteine domains. *Hum Mol Genet* 1993; 2:1813-1821
- Wang M, Wang JY, Cisler J et al. Three Novel Fibrillin Mutations in Exon 25 and 27: Classic Versus Neonatal Marfan Syndrome. *Hum Mut* 1997; 9:359-362
- Xiong W, Knispel RA, Dietz HC, Ramirez F, Baxter BT. Doxycycline delays aneurysm rupture in a mouse model of Marfan syndrome. *J Vasc Surg* 2008; 47:166-72.
- Yin W, Smiley E, Germiller J et al. Primary Structure and Development Expression of Fbn-1, the Mouse Fibrillin-Gene. *J Bio Chem* 1995; 270:1798-1806
- Yu R, Lai Z, Zhou W, Ti DD, Zhang XN. Recurrent FBN1 Mutation (R62C) in a Chinese Family With Isolated Ectopia Lentis. *Am J Ophthalmol* 2006; 141:1136–1138.
- Yuan X., Downing A.K., Knott V., Handford P. Solution structure of the transforming growth factor  $\beta$ -binding protein-like module, a domain associated with fibrils. *The EMBO Journal* 1997; 16;22: 6659-6666
- Zhang H, Apfelroth SD, Hu W et al. Structure and Expression of Fibrillin-2, A Novel Microfibrillar Component Preferentially Located in Elastic Matrices, *J Cell Biol*, 1994; 124 (5): 855-863

## 8. Anhang

### Danksagung

Mein Dank richtet sich in erster Linie an Herrn Dr. Peter N. Robinson (Nick), für die großartige Unterstützung, die exzellente Betreuung und die Geduld bei immer wieder neuen Fragen und Problemen, die sich im Rahmen dieser Arbeit ergaben. Das große Interesse und die konstruktiven Diskussionen haben sehr zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Ganz herzlich möchte ich auch Herrn Dr. Patrick Booms danken, der mir im Labor oft helfend zur Seite stand und ohne den die Zeit an der „Bench“ nur halb so schön gewesen wäre.

Allen Mitarbeitern aus dem Labor für pädiatrische Molekularbiologie in der Ziegelstrasse bin ich für die zahlreichen Hilfestellungen, die „Tipps und Tricks“ und vor allem für die schöne Zeit dort sehr dankbar.

Herrn Prof. Dr. Gerhard Gaedicke und Herrn Prof. Dr. Dr. Christian Hagemeyer danke ich für Möglichkeit, diese Arbeit im Labor für pädiatrische Molekularbiologie durchführen zu können und für die freundliche Unterstützung.

Schließlich danke ich auch der Charité für die finanzielle Unterstützung im Rahmen der Forschungsförderung.

Nicht zuletzt danke ich meiner Mutter, meiner Familie und meinen Freunden für das Vertrauen und die vielen aufmunternden Worte.

## Publikationsliste

Katzke S, Booms P, Tiecke F, Palz P, Pletschacher A, Türkmen S, Neumann L, Pregla R, Leitner C, Schramm C, Lorenz P, Hagemeyer C, Fuchs J, Skovby F, Rosenberg T, Robinson PN. **TGGE Screening of the entire FBN1 coding sequence in 126 individuals with Marfan syndrome and related fibrillinopathies.** Hum Mutat 2002; 20:197–208.

Tiecke F, Katzke S, Robinson P, Booms P, Hagemeyer C, Neumann L, Hinkel G, Brenner R, Hövels-Gürich H, Fuchs J, Skovby F, Rosenberg T. **Classic, early-onset severe and neonatal Marfan syndrome: twelve mutations and genotype-phenotype correlations in FBN1 exons 24–40.** Eur J Hum Genet 2001; 9:13–21.

Robinson PN, Booms P, Katzke S, Ladewig M, Neumann L, Palz P, Pregla R, Tiecke F, Rosenberg T. **Mutations and genotype-phenotype correlations in Marfan syndrome and related fibrillinopathies.** Hum Mutat 2002; 20:153–161

Palz M, Tiecke F, Booms P, Goldner B, Rosenberg T, Fuchs J, Skovby F, Schumacher H, Kaufmann UC, von Kodolitsch Y, Nienaber CA, Leitner C, Katzke S, Vetter B, Hagemeyer C, Robinson PN. **Clustering of mutations associated with mild Marfan-like phenotypes in the 3'0 region of FBN1 suggests a potential genotype-phenotype correlation.** Am J Med Genet 2000; 91:212–221

Katzke S, Booms P, Pletschacher A, Neumann L, Rosenberg T, Robinson PN. **TGGE Screening in Marfan Syndrome and other Fibrillinopathies: 53 Mutationen**, Posterpräsentation auf der 13. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Humangenetik in Leipzig (2.10.2002)

## **Lebenslauf**

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

## Eigenständigkeitserklärung

Ich, Stefanie Katzke, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema:  
„Die Sequenzierung der kodierenden Sequenz des *FBN1*-Gens bei 126 Patienten mit Marfan-Syndrom und verwandten Fibrillinopathien und die sich aus den gefundenen Mutationen ableitenden Genotyp-Phänotyp-Korrelationen“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.

Dresden, den 08.12.2009

Stefanie Katzke