

Aus dem KardioGenetischen Labor
der Franz-Volhard-Klinik Berlin Buch/
Medizinischen Fakultät Charité-Universitätsmedizin

DISSERTATION

**Neue Mutationen im Lamin A/C-Gen in Patienten
mit familiärer dilatativer Kardiomyopathie (fDCM)**

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité-Universitätsmedizin Berlin

von

Shwan Hussein

Aus Sulaimaniya

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. W. Haverkamp
2. Priv.-Doz. Dr. med. E. Schulze-Bahr
3. Priv.-Doz. Dr. med. P. Stawowy

Tag der mündlichen Prüfung: 28.08.2009

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS **I****ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS** **III**

1. EINLEITUNG	1
1.1 HERZINSUFFIZIENZ	1
1.1.1 ÄTIOLOGIE	1
1.2 KARDIOMYOPATHIEN	1
1.2.1 DILATATIVE KARDIOMYOPATHIE (DCM)	2
1.2.2 FAMILIÄRE DILATATIVE KARDIOMYOPATHIE (fDCM)	2
1.3 CHROMOSOMALE LOCI UND KRANKHEITSGENE	3
1.3.1 DAS LAMIN A/C UND SEINE MOLEKULARE STRUKTUR	5
1.3.2 LAMIN A/C-GEN	10
1.3.3 LAMIN-INTERAKTIONEN MIT ANDEREN NUKLEÄREN KOMPONENTEN	11
1.4 DIE LAMINOPATHIEN	13
1.4.1 GENOTYP-PHÄNOTYP-KORRELATION BEI LAMIN A/C-MUTATIONEN	14
2. Zielsetzung	16
3. MATERIAL UND METHODEN	17
3.1 METHODEN	17
3.1.1 KLINISCHE EVALUATION	17
3.1.2 GENETISCHE ANALYSE	17
3.1.2.1 DNA-EXTRAKTION	18
3.1.2.2 POLYMERASE-CHAIN-REAKTION (PCR)	19
3.1.2.3 MUTATIONSANALYSE	22
3.1.2.3.1 DNA DIREKTSEQUENZIERUNG	24
3.1.2.3.2 SINGLE-STRAND-CONFORMATIONAL-POLYMORPHISMUS (SSCP)	27
3.1.2.3.3 RESTRIKTIONS-FRAGMENT-LÄNGEN-POLYMORPHISMUS (RFLP)	29
3.2 AGAROSEGELELEKTROPHORESE	30
3.3 GERÄTE UND CHEMIKALIEN	31
3.3.1 GERÄTE	31
3.3.2 MATERIALIEN	32
3.3.3 CHEMIKALIEN	32
4. ERGEBNISSE	34
4.1 ERGEBNISSE DER PATIENTENUNTERSUCHUNG	34
4.2 PCR-OPTIMIERUNG	34
4.3 IDENTIFIKATION VON MUTATIONEN	39
4.3.1 EXON 3	39
4.3.2 EXON 4	43
4.3.3 EXON 11	46
4.4 IDENTIFIKATION VON SYNONYMEN SNPs	49

4.4.1 EXON 1	49
4.4.2 EXON 3	50
4.4.3 EXON 5	51
4.4.4 EXON 7	52
4.4.5 EXON 10	53
4.5 EXONS OHNE SNP	54
4.6 FAMILIEN	55
4.7 ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE	56
5. DISKUSSION	57
5.1 ÜBERBLICK	57
5.2 METHODEN	57
5.3 PRÄVALENZ DER MUTATIONEN IM LMNA GEN	57
5.4 DIE IDENTIFIZIERTEN MUTATIONEN	58
5.5 PHÄNOTYPISCHE AUSWIRKUNGEN DER MUTATIONEN IM LAMIN A/C-GEN	59
5.6 BEDEUTUNG DER MUTATIONEN AUF MOLEKULARER EBENE	61
5.7 EFFEKTE DER LAMIN A/C-MUTATIONEN IN DER PATHOGENESE DER DCM	64
5.8 WEITERFÜHRENDE UNTERSUCHUNGEN	67
6. ZUSAMMENFASSUNG	69
LITERATURVERZEICHNIS	71
DANKSAGUNG	77
ERKLÄRUNG	78
LEBENS LAUF	79
PUBLIKATION	81

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
ABI	Applied Biosystem (Firma)
ADP	Adenosindiphosphat
Ala	Alanin
Arg	Arginin
Asp	Asparaginsäure
ATP	Adenosintriphosphat
AVB	Atrioventrikulärer Block
bp	Basenpaare
C	Cytosin
°C	Grad Celsius
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
cm	Zentimeter
DCM	Dilatative Kardiomyopathie
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EKG	Elektrokardiogramm
Exo	Exonuklease
FAM	6-carboxyfluorescein (6-FAM)
F-Primer	<i>forward</i> -Primer
gDNA	genomische Desoxyribonukleinsäure
Glu	Glutaminsäure
G	Guanin
g	Gewichtskraft
HCM	Hypertrophe Kardiomyopathie
HiDi-Formamid	reines Formamid
His	Histidin
HPLC	Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie
JOE	2',7'-Dimethoxy-4',5'-dichloro-6-carboxy-fluorescein
KCL	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
KHK	Koronare Herzkrankheit
Leu	Leucin
Lys	Lysin
M	Mol
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minute

ml	Milliliter
mM	Millimol
mV	Millivolt
MVII	Molekulargewichtsmarker
NaOH	Natriumhydroxid
Ng	Nanogramm
Nr.	Nummer
PAA	Polyacrylamid
PCR	Polymerase-Kettenreaktion, <i>Polymerase-Chain-Reaction</i>
pH	Potentia Hydrogenii
Phe	Phenylalanin
RFLP	Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus
RNA	Ribonukleinsäure
ROX	<i>5-carboxy-X-rodamine</i>
R-Primer	<i>reverse-Primer</i>
Rsa I	Ein kloniertes Gen von <i>Rhodopseudomonas sphaeroides</i>
SAP	Shrimp Alkaline Phosphatase
SNP(s)	<i>Single Nucleotide Polymorphism(s)</i>
SSCP	<i>Single-Strand-Conformation-Polymorphism</i>
Syn.	Synonym
T	Thymin
TAMRA	<i>N,N,N,N-tetramethyl-6-carboxyrhodamin</i>
TBE	Tris-HCL-Borat-Ethylendiamintetraacetat
TEMED	Tetramethyldiamin
Thr	Threonin
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-propan-1,3-diol
U	Unit
Val	Valin
W	Wildtyp
WHO	<i>Wold Health Organisation</i>

1. Einleitung

1.1 Herzinsuffizienz

Herzinsuffizienz ist die Unfähigkeit des Herzens, trotz ausreichender Füllungsdrücke, ein für den Bedarf des Organismus ausreichendes Herzzeitvolumen zu fördern und/oder den venösen Rückfluss zum Herzen adäquat aufzunehmen. Herzinsuffizienz ist ein klinisches Syndrom, das durch belastungsabhängige Dyspnoe und Flüssigkeitsretention gekennzeichnet ist. Die Herzinsuffizienz wird durch eine Vielzahl kardialer und extrakardialer Störungen verursacht oder begünstigt und darf nicht unabhängig von der zugrunde liegenden Erkrankung betrachtet werden.

Herzinsuffizienz ist eine echte Volkskrankheit und eine häufige Ursache für Morbidität und Mortalität bei älteren Erwachsenen in der westlichen Welt. Die 5-Jahres-Überlebenschancen betragen insgesamt nur etwa 40-50%. Bei schwerer Herzinsuffizienz (NYHA Stadium III-IV) stirbt etwa die Hälfte der Patienten innerhalb eines Jahres [1].

1.1.1 Ätiologie

In der Ätiologie der Herzinsuffizienz hat sich ein grundlegender Wandel in den letzten 50 Jahren vollzogen. Die koronare Herzerkrankung ist heute mit ca. 60-70% die Hauptursache der Herzinsuffizienz [2]. Aber auch arterielle Hypertonie, die bei jedem zweiten Patienten mit KHK vorliegt, ist ein wichtiger, mit der koronaren Herzerkrankung beitragender Faktor. Eine isolierte arterielle Hypertonie ist nur noch für ca. 10% der Herzinsuffizienzfälle verantwortlich [3].

Neben der koronaren Herzerkrankung und der arteriellen Hypertonie ist die dilatative Kardiomyopathie die dritthäufigste Ursache einer Herzinsuffizienz (s. unten).

Seltener Ursachen einer Herzinsuffizienz sind Herzklappenerkrankungen, Diabetes mellitus und andere Faktoren, die mit Herzinsuffizienz assoziiert sind, wobei deren ätiologische Bedeutung nicht ganz geklärt ist. Diese Faktoren sind Übergewicht, männliches Geschlecht, geringe körperliche Aktivität und eine niedrige Schulbildung [4].

1.2 Kardiomyopathien

Kardiomyopathien sind eine heterogene Gruppe von Erkrankungen des Myokards, die zu einer mechanischen und/oder elektrischen Dysfunktion des Herzmuskels führen und meistens (aber nicht immer) inadäquate Ventrikelhypertrophie oder -dilatation aufweisen. Sie sind entweder nur

auf das Herz beschränkt oder manifestieren sich in der gemeinsamen Endstrecke der myokardialen Dysfunktion im Rahmen einer generalisierten Systemerkrankung und führen in der Regel zum Tode oder durch progressive Herzinsuffizienz zur Behinderung. Durch diese Definition wird deutlich, dass Kardiomyopathien durch eine Fülle von heterogenen Faktoren verursacht werden können [5].

Kardiomyopathien werden basierend auf dominanter Organmanifestation in 2 Hauptgruppen geteilt. Während primäre Kardiomyopathien (genetisch, gemischt, erworben) sich vorwiegend auf das Myokard beschränken und relativ selten sind, stellen sekundäre Kardiomyopathien das Involvieren des Myokards im Rahmen vieler verschiedener System- oder Multiorganerkrankungen dar und sind häufiger [5]. Diese sekundäre Kardiomyopathie entspricht der 'spezifischen Kardiomyopathie' in der bisherigen Klassifikation.

1.2.1 Dilatative Kardiomyopathie (DCM)

DCM ist eine Funktionsstörung des Myokards, die durch Dilatation und eine kontraktile Dysfunktion des linken und/oder des rechten Ventrikels charakterisiert ist. Ihre Inzidenz beträgt 7/100000 pro Jahr und ihre Prävalenz beträgt etwa 36,5 pro 100000 Einwohner, und sie ist die dritthäufigste Ursache für eine systolische Herzinsuffizienz und die häufigste Ursache für eine Herztransplantation [6]. Patienten mit DCM haben eine reduzierte Lebenserwartung. Die 5-Jahres-Mortalität hängt von der Ätiologie der myokardialen Funktionseinschränkung ab und liegt im Durchschnitt bei etwa 50% [7].

DCM wird durch eine Auswahl von diversen Bedingungen und Erkrankungen verursacht, die einen Myokardschaden oder einen Myokardverlust begünstigen. Zu ihnen gehören KHK, Myokarditiden, Autoimmunprozesse, toxische myokardiale Schädigungen und genetische Faktoren [8, 9]. Es konnte durch systematische Untersuchungen von DCM Patienten und deren Familien gezeigt werden, dass 25-30% aller DCM-Fälle genetisch bedingt sind [6].

Da DCM sowohl familiär mit altersabhängiger Penetranz als auch durch primäre und sekundäre Ursachen (infektiös, toxisch, autoimmun etc.) auftreten kann, wurde sie unter der Kategorie 'gemischt' (d.h. genetische und nicht-genetische Formen) eingeordnet.

1.2.2 Familiäre dilatative Kardiomyopathie (fDCM)

fDCM ist keine selten vorkommende Krankheit. Sie kann allerdings nicht nur aufgrund der klinischen und morphologischen Daten der Patienten sicher identifiziert werden. Hierzu wird ein Screening der Familienmitglieder benötigt. Das klinische Charakteristikum der Erkrankung entspricht den bei DCM erwähnten Charakteristika bei Ausschluss anderer Ursachen einer

Dilatation, wie KHK, Myokarditis, Autoimmunprozesse und toxische myokardiale Schädigungen. Die Diagnose von fDCM in einer Familie wird gestellt bei Vorhandensein von 2 oder mehr von DCM betroffenen Personen in derselben Familie oder bei Vorhandensein eines Verwandten ersten Grades eines DCM Betroffenen, der an ungeklärtem plötzlichem Herztod vor dem 35. Lebensjahr verstorben ist [10].

Zur Beurteilung des klinischen Status der Familienmitglieder mit fDCM wurden Kriterien (Hauptkriterien und Nebenkriterien) entwickelt. Die fDCM Familienmitglieder werden, je nachdem wie viele Kriterien sie erfüllen, unter die Kategorien betroffen, ungewiss und nicht betroffen eingeordnet [10].

Die Familiäre DCM weist eine große klinische Variabilität auf und kann mit der Erkrankung anderer Organe einhergehen: DCM mit Rhythmusstörung (Sinusbradykardie, atrioventrikulärer Block, supraventrikuläre Tachykardie), DCM assoziiert mit Skelettbeteiligung mit oder ohne Rhythmusstörung und DCM mit sensorischer Taubheit [11].

Abgesehen von der Familienanamnese gibt es bisher keine klinischen Parameter, anhand derer eine familiäre Form von einer nicht-familiären Form unterschieden werden kann. Während in einigen Fällen genetisch betroffene Individuen völlig klinisch symptomfrei sein können, weisen symptomatische Patienten der linksventrikulären Dysfunktion oder Arrhythmien zugeordneten Beschwerden auf wie Schwäche, Müdigkeit, Dyspnoe, Orthopnoe, Palpitationen oder Belastungsintoleranz. Die Symptome der Rechtsherzinsuffizienz wie periphere Ödeme, Zunahme des Bauchumfangs durch Stauungsleber und Aszites sind eher Zeichen einer Progression der Erkrankung [11].

Die Prävalenz von familiärer DCM variiert je nachdem, welche Methodik bzw. Diagnostik zur Identifizierung der Betroffenen verwendet wird. Studien, deren Daten lediglich auf positiver klinischer Anamnese der Betroffenen basieren, ergeben eine niedrige Prävalenz der familiären DCM. Im Gegensatz dazu ergeben Studien, in denen die Verwandten der Betroffenen systematisch untersucht werden, eine Prävalenz von etwa 35%. Diese systematische Untersuchung erfolgte unabhängig davon, ob die Verwandten symptomatisch waren oder nicht [12, 13].

1.3 Chromosomale Loci und Krankheitsgene

Das erste Krankheitsgen der familiären DCM wurde im Jahr 1998 von Olson et al. [14] beschrieben. Es war das kardiale α -Aktin, das auf dem Chromosom 15q14 lokalisiert ist. Bis heute wurden 24 verschiedene Gene als Krankheitsgene beschrieben. Diese Gene kodieren u.a.

für Sarkomer, Proteine im Bereich der intermediären Filamente und Ionenkanäle (s. Tabelle 1). Mutationen in allen übrigen Genen außer LMNA verursachen ebenfalls eine reine DCM. Sie scheinen allerdings mit Ausnahme von β -Myosin und Troponin T nur selten für die familiäre DCM verantwortlich zu sein. Im Gegensatz dazu treten Mutationen im β -Myosin-Gen häufiger als in ca. 9% aller Patienten mit familiärer DCM ohne skelettmuskuläre Beteiligung und ohne AV-Block auf. Das kardiale Troponin T steht an zweiter Stelle in der Häufigkeit mit ca. 3% aller reinen DCM-Fälle [4].

Tabelle 1: DCM-Krankheitsgene, eine Übersicht der bisher bekannten Krankheitsgene, deren zu kodierenden Proteine und ihre Lokalisationen und chromosomale Loci (Tabelle entnommen aus Osterziel KJ, et al.)

Protein	Gen	Chromosom	Lokalisation
β -Myosin-Schwerkette	MYH7	14q11	Sarkomer
Lamin A/C	LMNA	1q22	Zellkernmembran
Troponin T	TNNT2	1q32	Sarkomer
α -Actinin 2	ACTN2	1q43	Z-Scheibe
α -Myosin-Schwerkette	MYH6	14q11	Sarkomer
α -Tropomyosin	TPM1	15q22	Sarkomer
ATP-sensitiver Kaliumkanal	ABCC9	12q12	Zellmembran
Kardiales α -Actin	ACTC	15q14	Sarkomer
Kardialer Natriumkanal 5A	SCN5A	3q22	Zellmembran
Cypher/ZASP	LDB3	10q23	Zytoskelett
δ -Sarkoglykan	SGCD	15q33	Zytoskelett
Desmin	DES	2q35	Zytoskelett
Eye absent homolog 4	EYA4	6q23	Zellkern
Metavinculin	VCL	10q22	Zell-Zell-Kontakt
Muscle LIM protein	CSRP3	11q15	Z-Scheibe
Myosin-binding-protein c	MYBPC3	11q11	Sarkomer
Phospholamban	PLN	6q22	Sarkoplasmatisches Retikulum
Telethonin/Titin-cap	TCAP	17q12	Z-Scheibe
Titin	TTN	2q31	Sarkomer
Troponin C	TNNC1	3q21	Sarkomer
Desmoplakin	DSP	6q24	Desmosom
Troponin I	TNNI3	19q13	Sarkomer
Dystrophin	DMD	Xq21	Zytoskelett
Tafazzin	TAZ/G4.5	Xq28	Mitochondrien

Neben diesen familiären DCM-Formen, die ausschließlich auf den Herzmuskel beschränkt sind, gibt es Formen, in denen DCM mit Erregungsleitungsstörungen assoziiert vorkommen. Für diese familiäre DCM-Form ist das Lamin A/C-Gen verantwortlich. Es kodiert ein Protein, das am Aufbau der an der inneren Zellkernmembran lokalisierten Kernlamina beteiligt ist. Mutationen im Lamin A/C-Gen werden für 8% der familiären DCM-Fälle verantwortlich gemacht.

Beschrieben worden sind auch Muskeldystrophien bei wenigen familiären DCM-Patienten, die Mutationen im Lamin A/C-Gen aufweisen [15].

Der häufigste Erbgang bei familiärer DCM ist in etwa 70-80% der Fälle eine autosomal-dominante Form. Andere Erbgänge wie X-chromosomaler und autosomal-rezessiver Erbgang machen jeweils 10-15% der familiären DCM-Fälle aus. Ein wichtiges Gen im Zusammenhang mit X-chromosomalem Erbgang ist das Dystrophin-Gen, das ein Teil des Dystrophin-Sarkoglykan-Komplexes ist. Dieser Komplex ist für die Stabilität der Myozyten und die Kraftübertragung vom Sarkomer auf benachbarte Myozyten verantwortlich [12, 16]. Mutationen in Troponin I und Desmoplakin stellen seltene Ursachen der rezessiven DCM dar [17].

Mutationen in mitochondrialer DNA sind in einigen Fällen beschrieben worden. Insbesondere sind in Zusammenhang mit DCM bei Ausbruch der Krankheit im Kindesalter mitochondriale Punktmutationen und Deletionen beschrieben worden [18].

Die genetische und klinische Heterogenität der DCM zeigt, dass ein einziges Gen zwar als verursachend angesehen werden kann, aber die Expressivität von anderen genetischen- und Umweltfaktoren beeinflusst werden kann [16]. Man geht davon aus, dass einige modifizierende, protektiv wirkende Faktoren die Entwicklung einer DCM zu verhindern scheinen. Denn Angehörige einiger Familien weisen zwar die krankheitsverursachende Mutation auf, entwickeln aber keine DCM.

1.3.1 Das Lamin A/C und seine molekulare Struktur

In einer eukaryotischen Zelle sind die zytoplasmatischen und nukleoplasmatischen Räume durch die Zellkernhülle (*Nuclear Envelope NE*) voneinander getrennt. Diese Kernhülle besteht aus 3 Hauptkomponenten: die innere und äußere Membran und der dazwischen liegende Raum (perinukleäre Zisterne) und dessen Inhalt; die Porenkomplexe, die in der doppelten Membran der Kernhülle eingebaut sind und einen bidirektionalen Verkehr von Molekülen zwischen dem Zytoplasma und dem Kernplasma erlauben; und die nukleäre Lamina, die aus Proteinen vom Intermediärfilament-Typ V bestehen und ähnlich wie ein Netzwerk aus annähernd tetragonal orientierenden Filamenten an der inneren Kernmembran- dem Kernplasma zugewandt- lokalisiert sind [19, 20] (Abb.1).

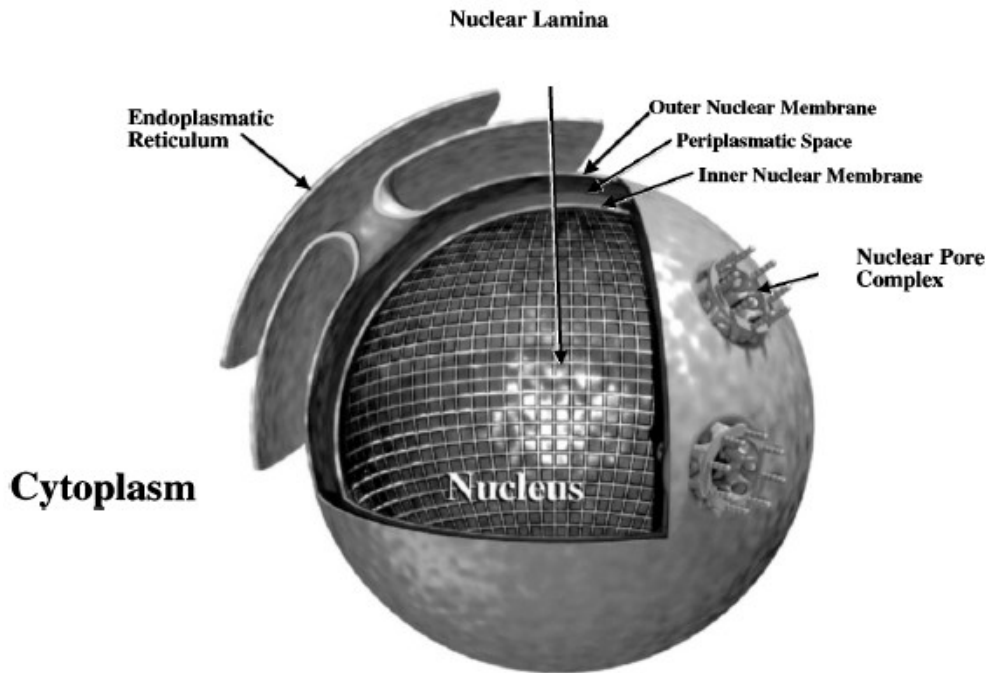


Abbildung.1: Schematische Darstellung der Kernhülle (*nuclear envelope*) einer eukaryotischen Interphase-Zelle. In der Abbildung sind bestimmte Komponenten der Kernhüllen dargestellt: die innere und die äußere Kernmembran, nukleäre Lamina und Kern-Poren-Komplexe. Abbildung entnommen aus *Stuurman et al. 1998*.

Die Lamin-Proteine sind die Hauptbestandteile des Proteingerüsts der Kernlamina und der Kernarchitektur. Diese Lamin-Proteine gehören zu dem Intermediärfilament-Typ V und haben eine kurze N-terminale Domäne (*head*), eine lange α -helikale coiled-coil-Domäne (*rod*) und eine globuläre C-terminale Domäne (*tail*). Während die *rod*-Domäne eine große Rolle bei der Dimerisation spielt, spielen die *head*- und *tail*-Domäne bei der Bildung von Polymer und höherem Ordnungsgrad eine wichtige Rolle [19]. Mutation-Transfektionstudien und *in vitro*-Assembly-Studien zeigen, dass diese 2 Domänen, nämlich *head*- und *tail*-Domäne des IF, eine entscheidende Rolle in der Bildung eines höheren Polymerisationsgrades wie *head-to-tail* Polymerisation spielen [21, 22].

Wie den Abbildungen 3 und 25 (S.56) zu entnehmen ist, kann die α -helikale *rod*-Domäne in 3-4 Segmente unterteilt werden, welche durch nicht- α -helikale Linker-Regionen in anderen intermediären Filamenten und durch α -helikale Linker-Regionen in den nukleären Laminen voneinander getrennt sind. Dabei werden die α -helikale Segmente mit 1A, 1B, 2A und 2B, die Linker-Regionen mit L1, L12 und L2 bezeichnet (Abb.25, S.56). Da der *coil* 1B 6 zusätzliches Heptad-Wiederholungsmuster beinhaltet, ist die *rod*-Domäne der Lamine mit 354 Aminosäuren

(~52 nm) länger als die des I-IV intermediären Filaments der Wirbeltiere mit 310 Aminosäuren (~45 nm) [23, 24].

Interessanterweise sind die Länge und die Aminosäuresequenz dieser Linker-Regionen hoch konserviert [19], was die Wichtigkeit dieser Regionen und die Erfüllung einer wichtigen Funktion untermauert.

Ebenfalls hoch konserviert sind das N-terminale Ende, das aus 16 Aminosäuren besteht und das C-terminale Ende, das aus 30 Aminosäuren besteht. In der C-terminalen *tail*-Domäne ist ein wichtiger Bestandteil des Lamins lokalisiert, nämlich das nukleäre Lokalisationssignal. Es ist für den Import des Lamins in den Zellkern verantwortlich [25]. In den Regionen, die an beiden Enden der α -helikalen rod-Domäne angrenzen, sind die Phosphoakzeptor-Regionen (P-sites) lokalisiert. Bestimmte Aminosäuren dieser P-Seiten werden während der Mitose von der Mitose-spezifischen *cdc-2*-Kinase phosphoryliert. Dieser Mechanismus scheint einen wichtigen Einfluss auf die morphologische Veränderung und Disassemblierung des Lamins zu haben [26, 27]. Ein weiterer Bestandteil des Lamin, mit Ausnahme von Lamin C und C2, ist das C-terminale CAAX-Motif (C für Cystein, A für eine aliphatische Aminosäure und X für beliebige Aminosäuren) (Abb.3 und 25), welches posttranslational durch Farnesylation modifiziert wird. Diese Modifizierung und auch das Processing, in dem die AAX Aminosäuren abgespalten werden, spielen eine große Rolle in der Umwandlung von Lamin aus Prelamin. Der Abspaltprozess erfolgt im Falle von Prelamin A mit der Endoprotease ZMPSTE24 [28, 29].

Die Primärstruktur eines Lamin-Moleküls ist der Primärstruktur eines Myosin-Moleküls sehr ähnlich. Dementsprechend beinhaltet die Aminosäuresequenz der α -helikalen *rod*-Domäne ein charakteristisches Heptad-Wiederholungsmuster, das aus hydrophoben und polaren Aminosäuren besteht. Dieses Heptad-Wiederholungsmuster wird mit den Buchstaben a, b, c, d, e, f und g bezeichnet, wobei a und d die hydrophoben Aminosäuren und e und g die geladenen Aminosäuren darstellen (Abb. 2). Durch ihren hydrophoben Effekt können a und d für eine Bindung mit dem a und dem d einer anderen α -Helix sorgen. Weitere interhelikale Bindungen können durch Bildung von Ionenpaaren entstehen wie z.B. zwischen e und g. Ionenpaare können auch innerhalb einer Helix entstehen und zwar zwischen sauren und basischen Aminosäuren. Diese Ionenpaare kommen immer in exakten Abständen von 4 Aminosäuren vor. Die intrahelikale Ionenbindung gewährleistet eine zusätzliche Stabilisierung einer α -Helix. Wie in der Abb. 2 ersichtlich wird, kommen die geladenen Aminosäuren in der Regel an der Außenfläche eines Dimers vor, welche nicht nur für die Bildung eines Ionenpaars wichtig sind, sondern auch für die höhergradige Vernetzung [19, 30].

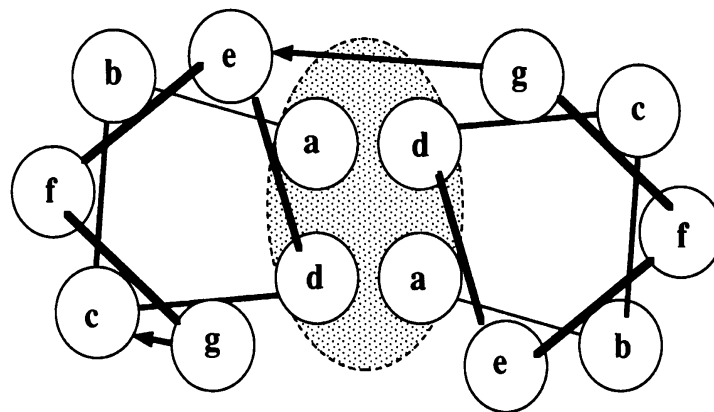


Abbildung 2: Ein senkrechter Schnitt zur Längsachse eines coiled-coil-Dimers. Diese Abbildung zeigt die Ionen-Paarung in einem coiled-coil-Dimer. A und d sind hydrophob und tragen durch ihren hydrophoben Effekt zur Stabilisierung des Dimers bei. Der lange Pfeil zeigt ein interhelikales, der kurze ein intrahelikales Ionenpaar. Abbildung entnommen aus *Latei and Fuchs 1995*.

Demnach können zwei solche α -Helices sich in einer parallelen Richtung umeinander wickeln. Während die hydrophobe Seite einer α -Helix mit der einer anderen interagiert, bleibt die hydrophile Seite der wässrigen Umgebung ausgesetzt. Auf diese Weise ist die Primärstruktur in der Lage, eine Bindung mit einer ähnlichen α -Helix und damit eine stabile 2-strängige α -helikale coiled-coil-Struktur zu bilden (Abb.3) [19].

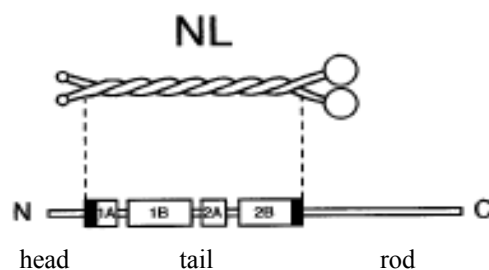


Abbildung 3: Schematische Darstellung eines nukleären Lamin-Dimers und seine primäre Sequenz. Die Abbildung zeigt zwei im Bereich der α -helikalen *rod*-Domäne umeinander gewickelte Lamine (oben) und die entsprechende Primärsequenz (unten). Abbildung entnommen aus *Stuurman et al. 1998*.

Entlang so einer 2-strängigen Struktur scheinen sich die Verteilungsmuster der sauren und basischen Aminosäuren in bestimmten Abständen, etwa alle 9,5 Aminosäuren zu wiederholen. Diese Periodizität führt wahrscheinlich zu einer seitlichen elektrostatischen Interaktion zwischen den α -helikalen coiled-coils, was die Bildung eines weiteren Bildungsgrades und die Entstehung

von Oligomere begünstigt. Diese Makromoleküle dienen als Bausteine für die Bildung von Protofilamenten, Protofibrillen und Halbfilamenten [19, 23].

Diese elementare Struktureinheit, nämlich das 2-strängige α -helikale *coiled-coil*-Dimer, ist charakteristisch für alle intermediären Filamente. Bei der Bildung eines Polymers lehnt sich die *tail*-Domäne eines 2-strängigen Dimers in die longitudinale Richtung an die *head*-Domäne eines anderen an (Abb.4). Dabei grenzt ein Ende dieses 2-strängigen Dimers an 2 globuläre *head*-Domänen, das andere Ende an 2 C-terminale *tail*-Domänen. Auf diese Art und Weise werden *head-to-tail*-Polymere gebildet. Diese Lamin-Polymere assoziieren wiederum miteinander und zwar seitlich oder antiparallel, so dass ein 24-25 nm langes perlschnurartiges Filament entsteht [31, 32]. Aber dieses Filament scheint jedoch, zumindest *in vitro*, instabil zu sein. Deshalb werden diese Polymere miteinander weitere seitliche Verbindungen eingehen, so dass dadurch Fasern und größere parakristalline Strukturen entstehen [20]. Ob ebenfalls *in vivo* Lamin A und C solch eine höhere Anordnung anstreben, ist noch unklar. Die bisherigen Daten basieren größtenteils auf *in vitro* Experimenten.

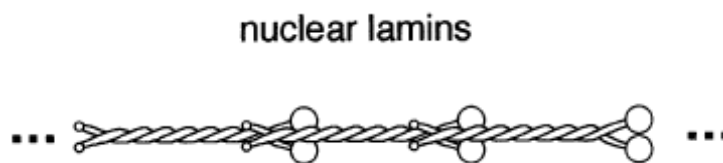


Abbildung 4: Schematische Darstellung eines Lamin-Oligomers. Die Abbildung zeigt, wie die *tail*-Domäne eines Lamin-Dimers sich an die *head*-Domäne eines anderen Lamin-Dimers anlehnt, um Polymere zu bilden. Abbildung entnommen aus *Stuurman et al. 1998*.

Die Polymerisation und Depolymerisation der Lamine sind dynamische Prozesse. Denn während der Mitose sind die Lamine depolymerisiert, um sich dann später zusammenzubauen.

In der Telophase und der frühen G1-Phase wird der Nukleus der Tochterzelle seine Lamin-Struktur neu arrangieren. In dieser Phase sind die Lamine relativ mobil. Aber später in der Interphase sind die Lamine polymerisiert und beinahe immobil.

Viele Studien zeigen, dass dieses dynamische Verhalten der Lamine durch posttranslationale Modifikationen (z.B. Phosphorylation, Dephosphorylation) und von Lamin-bindenden Komponenten reguliert wird [33, 34].

1.3.2 Lamin A/C-Gen

Alle Lamine werden von 3 Genen kodiert: LMNA, LMNB1 und LMNB2. Während LMNA Lamin-A, -A Δ 10, -C und -C2 kodiert, kodieren LMNB1 das Lamin-B1 und LMNB2 das Lamin-B2 und -B3, wobei das Lamin-B3 eine Splice-Variante des Lamin-B2 darstellt. Die Lamine A und C sind die Hauptprodukte des LMNA-Gens, welches auf dem Chromosom 1q21.2-q21.3 liegt. Es ist 57,6 Kb groß und besteht aus 12 Exons (Abb.5). Diese 2 Proteine werden annähernd in gleicher Menge produziert, wobei das Lamin-C durch eine Splice-Stelle im Intron 10 entsteht. Das Lamin-C wird von Exons 1-9 und einem Teil des Exon 10 kodiert. Das Lamin-A entsteht durch alternatives Splicen. Dabei werden die Exons 11 und 12 zu den Exons 1-9 addiert, und die Lamin-C-spezifische Portion des Exon 10 wird beseitigt [33] (Abb.5).

Die Expression von Lamin-B1 und -B2 hat sich während der Entwicklung in allen Zellen der Säugetiere bewahrt, während Lamin-A nur in differenzierten somatischen Zellen exprimiert wird. Im Gegensatz zu Lamin-A Δ 10, dessen Expression nur in Zelllinien beschrieben wurde, die sich aus Kolon-, Lungen- und Mammakarzinom herleiten, ist die Expression des Lamin-C2 nur auf Hoden beschränkt und zwar während der Spermatogenese [35].

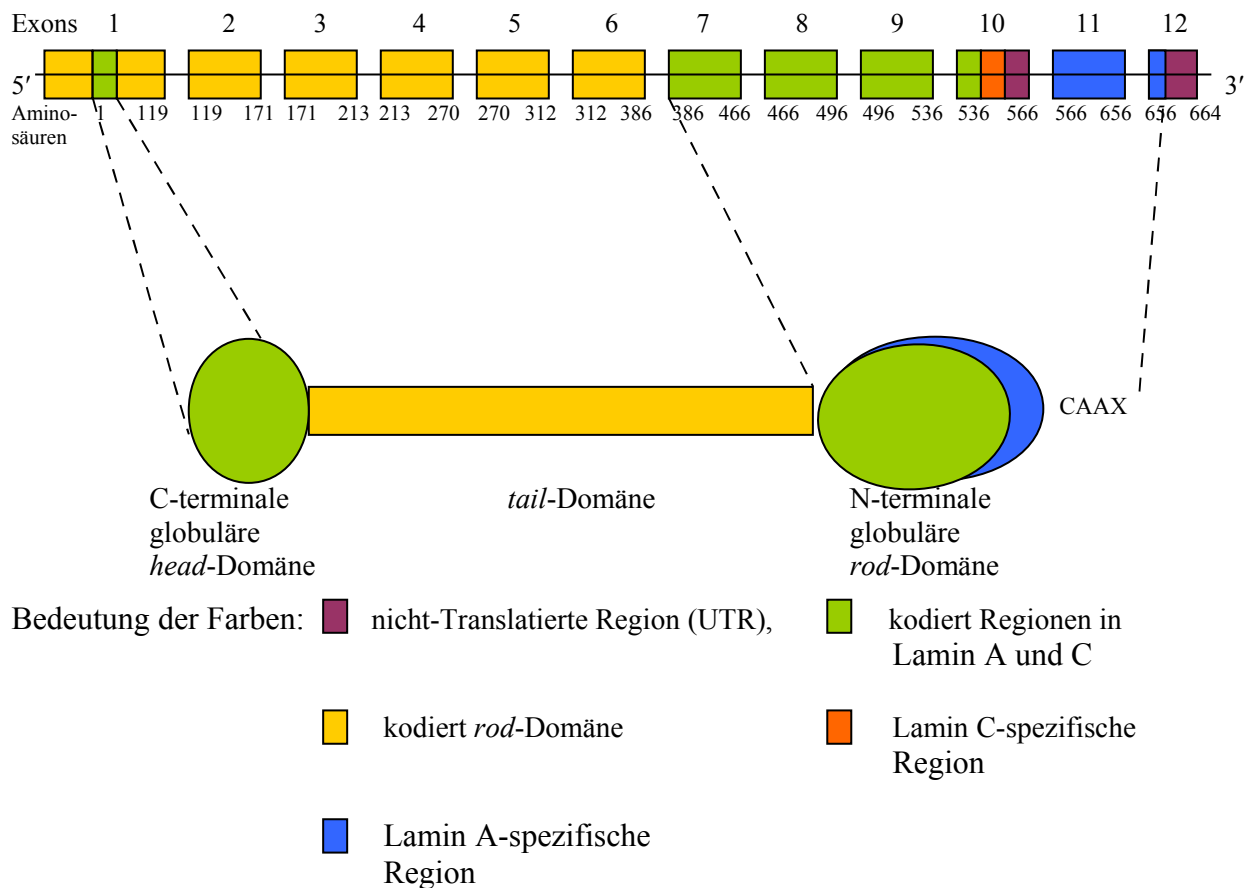


Abbildung.5: Die Abbildung zeigt das LMNA Gen, das 57,6 Kb groß ist und aus 12 Exons besteht, und Lamin A, das aus zwei globulären Domänen und einer α -helikalen rod-Domäne besteht. Lamin C (nicht gezeigt) wird von Exons 1-9 und einem Teil von 10 kodiert. Lamin C resultiert aus alternativem Splicing, in dem noch Exons 11 und 12 addiert werden und die Lamin C-spezifische Portion im Exon 10 beseitigt wird. Modifiziert nach *Cpell et. al. 2006*.

1.3.3 Lamin-Interaktionen mit anderen nukleären Komponenten

Es wird immer klarer, dass Lamin-Proteine an diversen intrazellulären Kaskaden beteiligt sind und ein breites Spektrum von Funktionen unterstützen. Sie können diese wichtigen Funktionen durch ihre Interaktionen mit verschiedenen intranukleären Proteinen und mit den inneren und äußeren nukleären Membranen erfüllen. Zu ihren wichtigen Aufgaben gehören die mechanische Stabilisierung des Zellkerns, die DNA-Replikation und RNA-Transkription, die Regulation des Zellzyklus, Zellwachstum und -differenzierung, Apoptose, Chromatinorganisation, räumliche Anordnung des nukleären Porenkomplexes und die Verankerung der an der inneren Kernmembran (*INM*) vorkommenden Proteine (Lamin-bindende Proteine). Letztere sind nicht nur wichtig für das Verstehen von unbekannt Funktionen von Laminen in der Zelle, sondern

auch um die komplexen Pathomechanismen von verschiedenen hereditären und sporadischen Erkrankungen zu definieren, die durch Mutationen sowohl in Lamin als auch in Lamin-bindenden Proteinen verursacht werden. Soweit sind mehr als 20 solcher Proteine einschließlich der Splicevarianten beschrieben worden. Viele von diesen Proteinen, wenn nicht alle, scheinen mit Laminen direkt Verbindungen einzugehen (Abb.6) [36]. Damit wird klar, dass nicht nur Lamin-Proteine, sondern auch die Untersuchung der Lamin-bindenden Proteine wichtig sind, um die weiteren Funktionen der Lamine und die komplexen intrazellulären Kaskaden aufzudecken, die in verschiedenen Laminopathien (s.unten) involviert sind.

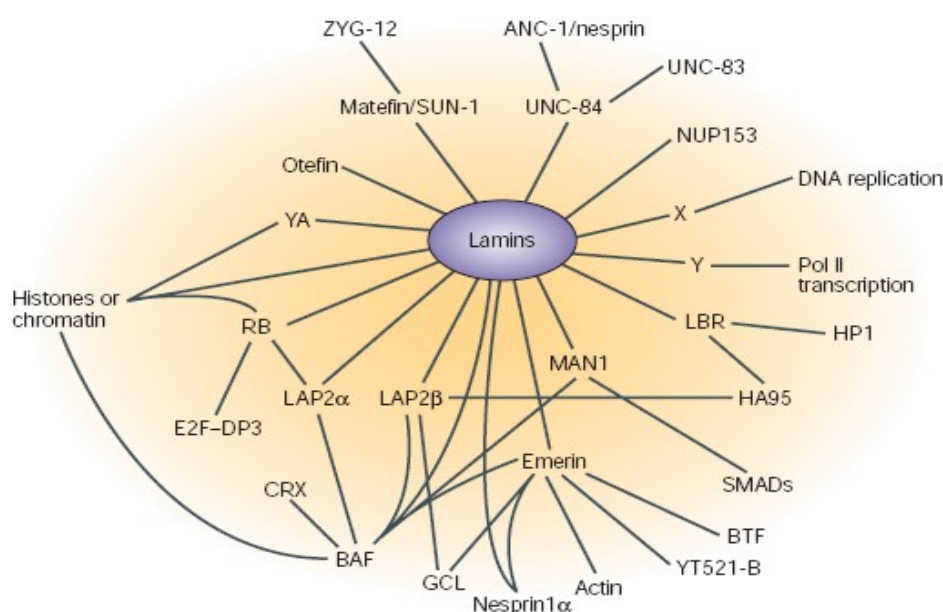


Abbildung.6: Eine Zusammenfassung der komplexen Interaktionen zwischen verschiedenen Proteinen und nukleären Laminen. Die Linien kennzeichnen entweder eine direkte Interaktion oder eine von Lamine abhängige Aktivität. X und Y stehen für unbekannte Proteine.

BAF, Barrier-to-autointegration factor; BTF, BCL2-associated transcription factor; CRX, Cone-rod homeobox; GCL, Germ cell-less; HP1, Heterochromatin protein-1; LAP1/2 β , Lamin-associated polypeptides-1 and -2 β ; LBR, Lamin-B receptor; Pol II, RNA polymerase II; RB, Retinoblastoma protein; YA, Young arrest

Eine Interaktion zwischen Laminen und Chromatin, direkt oder indirekt, gilt als unumstritten. Es ist bekannt, dass in den meisten Zellen der größte Teil von Heterochromatin in der Peripherie des Nukleus lokalisiert ist. Für die Anheftung des Chromatins an der Kernhülle scheint Lamin maßgeblich zu sein. Studien mittels LMNA-Knockout-Mäusen zeigten, dass in den Myozyten und Fibroblasten von LMNA^{-/-}-Mäusen das Chromatin nicht mehr in der Zellkernperipherie

nachweisbar ist. Dieses Phänomen wurde ebenfalls in den Fibroblasten von Patienten mit Hutchinson-Gilford-Progeriesyndrom (HGPS) nachgewiesen [37].

Diese Anheftung des Chromatins erfolgt nicht nur durch eine direkte Verbindung zwischen Lamin und Chromatin, sondern wird auch indirekt durch eine Verbindung zwischen Chromatin und Membranproteinen, die wiederum mit Lamin interagieren, vermittelt. Ein charakteristisches Beispiel für so ein Membranprotein ist LBR (Lamin B-bindender Rezeptor). LBR ist ein membranintegriertes Protein, das nicht nur Lamin B bindet, sondern, zumindest *in vitro*, viele andere Strukturen bindet wie Doppelstrang-DNA, Histone H2-H4, Chromatin-assoziiertes Protein (HA95) und Heterochromatin-Protein-1 (HP-1).

Die oben erwähnten Interaktionen zeigen, wie komplex die Zusammenhänge zwischen Laminen und anderen intranukleären Komponenten einerseits und die Zusammenhänge zwischen den einzelnen intranukleären Proteinen andererseits sind.

1.4 Die Laminopathien

Unter "Laminopathien" wird eine Gruppe von hereditären Erkrankungen zusammengefasst, die durch Mutationen in Genen hervorgerufen werden, die nukleäre Lamine und Lamin-assoziierte Proteine kodieren [38].

Bisher sind im ganzen LMNA-Gen mehr als 180 Mutationen beschrieben worden, die Krankheiten in verschiedenen Organen verursachen. Die wichtigsten dieser Erkrankungen sind Emery-Dreifuss-Muskeldystrophie (EDMD2), Glieder-Gürtel-Muskeldystrophie (LGMD1B), dilatative Kardiomyopathie DCM (CMD1A) und familiäre partielle Lipodystrophie[39].

In diesem Zusammenhang sind insbesondere Lamin-A und Emerin zu erwähnen. Letzteres ist ein Lamin-bindendes Protein, dessen Mutationen Emery-Dreifuss-Muskeldystrophie (EDMD) verursachen. Diese Krankheit wird X-chromosomal vererbt und ist durch Sehnenkontrakturen, Muskelschwäche der oberen und unteren Extremitäten, Kardiomyopathie und Erregungsleitungsstörung charakterisiert. Eine klinisch identische, sowohl autosomal-dominante als auch rezessive Form von EDMD wurde auch im LMNA-Gen beschrieben. Eine heterozygote Mutation in Lamin-B-Rezeptor, das ebenfalls ein Lamin-bindendes Protein ist, verursacht Pelger-Huet-Anomalie (PHA) in den Granulozyten. Die gleiche Mutation, aber in homozygoter Form, führt zu Greenberg-Skelett-Dysplasie, was bei Embryonen Chondrodysplasie verursacht und letal endet [38].

Einige dominante Mutationen verursachen Glieder-Gürtel-Muskeldystrophie oder dilatative Kardiomyopathie, die jeweils mit Reizleitungsstörung assoziiert sind. Die einzige Krankheit, bei der Mutationen gehäuft in der *tail*-Domäne des Lamin-A vorkommen, ist die autosomal-

dominante familiäre partielle Lipodystrophie vom Typ Dunnigan. Diese Krankheit ist charakterisiert durch fehlendes Fettgewebe an den Extremitäten, vermehrtes Fett am Gesicht und am Nacken, Insulinresistenz und damit häufig Diabetes mellitus. Rezessive Laminopathien, die durch Mutationen in der *tail*-Domäne des Lamin-A verursacht werden, sind axonale Neuropathie (*Charcot-Marie-tooth*-Krankheit Typ-2) oder Skelett-Malformation assoziiert mit postnataler Wachstumsretardierung, pigmentierter und marmorierter Haut und partieller Lipodystrophie (mandibuloakrale Dysplasie) [38, 40].

Die vorzeitige Alterung (*Hutchison-Gilford-Progerie*-Syndrom; HGPS) ist eine Krankheit, die durch eine Mutation zustande kommt, die eine Deletion von 50 Aminosäuren von der *tail*-Domäne des Lamin-A hervorruft. HGPS ist charakterisiert durch Wachstumsretardierung, vermindertes subkutanes Fett, Atherosklerose, Knochendeformationen, verspätete Dentition, Glatze, Sklerodermie und kardiovaskuläre Erkrankungen. Mutationen in der *rod*-Domäne können atypisches HGPS und andere Formen von Progerie (atypisches Werner-Syndrom) verursachen [41].

Ein Phänotyp, der durch eine beliebige Mutation im LMNA-Gen hervorgerufen wird, kann individuell und interindividuell unterschiedliche Ausprägung haben. Es gibt aber auch Patienten, die bei Vorhandensein einer einzigen Mutation an verschiedenen Erkrankungen leiden. Diese Tatsache deutet darauf hin, dass möglicherweise eine einzige Mutation im Lamin zum Ausfall oder zumindest zur Störung mehrerer Interaktionen zwischen der durch die Mutation beschädigten Region des Lamin und den mit ihr interagierenden Proteinen führt.

1.4.1 Genotyp-Phänotyp-Korrelation bei Lamin A/C-Mutationen

Mit der Aufklärung von LMNA als Krankheitsgen hoffte man, die erheblichen Phänotypvariationen, den Verlauf und die Geschlechtsbevorzugung erklären zu können. Es ist mittlerweile unumstritten, dass Mutationen im Lamin-A/C einen malignen Verlauf mit erhöhtem Risiko für plötzlichen Herztod und dem Bedarf der Herztransplantation zeigen. Taylor et al [11] fand heraus, dass 8 von 12 Mutationsträgern eine Herztransplantation benötigten oder eine sehr schlechte Myokardfunktion zwischen dem 30. und 50. Lebensjahr entwickelten. Im Vergleich zu Patienten mit DCM ohne Mutationen im LMNA war die kardiovaskuläre Mortalität bei den Mutationsträgern durch plötzlichen Herztod oder dekompensierte Herzinsuffizienz signifikant schlechter. Eine weitere Beobachtung von dieser Arbeitsgruppe war ein milder Phänotyp mit isolierter DCM, die durch die Mutation S573L verursacht war. Diese Mutation ist nur auf die *tail*-Region von der Lamin-A-Isoform beschränkt. Ähnliche Phänotypen wurden ebenfalls von anderen Autoren beschrieben, z.B. Fatkin et al. [42] identifizierte eine Mutation, die nur auf

Lamin-C-Isoform beschränkt war und eine DCM mit milderem Verlauf verursachte. Diese Daten könnten zeigen, dass eine isolierte Involvierung von entweder Lamin-A oder -C eine DCM mit milderem Verlauf zur Folge hat.

Es wird kontrovers diskutiert, welche Erstsymptome oder Frühzeichen die Patienten entwickeln, die Träger von Mutationen im Lamin-A/C-Gen sind. Es ist unumstritten, dass die meisten identifizierten Mutationen im Lamin-A/C mit Herzrhythmus- und Reizleitungsstörungen in Kombination mit DCM assoziiert sind [42-45]. Aber auch Skelettmypopathien kombiniert mit DCM und Rhythmusstörung wurden bisher im Zusammenhang mit Lamin-A/C-Mutationen von vielen Autoren berichtet [46-48]. Während manche Autoren von einem überzeugenden Prädiktor für LMNA-Mutation in Patienten mit DCM bei Vorhandensein von Anzeichen einer Skelettmuskelabnormalität wie eine erhöhte Kreatininkinase im Serum, ein Hinweis auf Muskeldystrophie oder eine positive Familienanamnese für Muskelerkrankung sprechen [15], berichten andere Autoren über Herzrhythmus- und Reizleitungsstörung als Erstanzeichen für LMNA-Mutation [49].

Der Grund dafür, warum bei einigen Patienten der Effekt einer Mutation im LMNA-Gen nur auf ein einziges Organ beschränkt ist, während bei anderen sowohl Skelett- als auch Herzmuskulatur involviert sind, ist unklar. Brodsky et al. [50] identifizierte eine Deletion auf der Position 959 im Exon 6, die in einer Familie DCM mit Erregungsleitungsstörung, EDMD und LGMD verursachte. Diese Daten zeigen eine große Variabilität der phänotypischen Ausprägung nicht nur zwischen verschiedenen Mutationen bei unverwandten Familien, sondern auch innerhalb einzelner Familien mit identischer Mutation. Daher müssen weitere Faktoren die klinische Ausprägung der verschiedenen Phänotypen beeinflussen. Faktoren, die in diesem Zusammenhang diskutiert werden, sind erworbene und umweltbedingte Faktoren. Aber auch der Einfluss des Geschlechtes und der genetische Hintergrund eines Individuums im Sinne sog. *Modifier*-Gene oder eine Kombination aus mehreren Faktoren scheinen eine wichtige Rolle zu spielen. Das Vorkommen von klinisch unauffälligen Trägern einer Mutation im LMNA-Gen, was man als nichtpenetrante Mutation bezeichnet, spricht für das Vorhandensein von *Modifier*-Genen und anderen genetischen und umweltbedingten Faktoren, die die Ausprägung eines Phänotyps mitbestimmen [11].

Solche *Modifier*-Gene modifizieren wahrscheinlich den Schweregrad des DCM Phänotyps, wie etwa das Ausmaß der Dilatation, die Altersabhängigkeit der Penetranz, die Entwicklung einer manifesten Herzinsuffizienz oder das Risiko eines plötzlichen Herztodes [51].

2. Zielsetzung

Die DCM ist die häufigste Form der Kardiomyopathie und ist die häufigste Ursache für eine Herztransplantation. Etwa 25-30% der dilatativen Kardiomyopathien haben eine genetische Ursache. In den letzten Jahren wurden die dafür verantwortlichen Mutationen in 24 verschiedenen Genen identifiziert.

Das Lamin A/C Gen ist ein wichtiges krankheitsverursachendes Gen der familiären dilatativen Kardiomyopathie mit Erregungsleitungsstörung. Obwohl Mutationen im Lamin A/C Gen für ca. 8% der DCM-Fälle verantwortlich sind, konnte bisher kein direkter Zusammenhang zwischen den identifizierten Mutationen in diesem Gen und einer Beeinträchtigung der Kraftübertragung und -erzeugung oder Apoptose der Herzmuskelzellen nachgewiesen werden.

Ziel dieser Arbeit soll die genetische Analyse aller 12 kodierenden Exons des Lamin A/C Gens in einem Kollektiv von nichtverwandten Patienten mit familiärer DCM sein. Dabei sollen Methoden etabliert werden, die uns ermöglichen, jegliche Abweichungen zu einer Referenzsequenz zu entdecken und nachzuweisen. Die genetische Analyse soll Aufschluss darüber bringen, ob genetische Varianten (Mutationen oder Polymorphismen) im Gen auftreten und mit einer DCM assoziieren. Dafür werden Methoden wie die Direktsequenzierung, der Restriktionsverdau und die Einzelstrang-Konformations-Analyse herangezogen. Die neuen und bereits bekannten Varianten sollen näher betrachtet werden. Diese sollen auch in einer großen Gruppe idiopathischer DCM-Patienten und Kontrollen bestimmt werden, um deren Bedeutung näher zu analysieren.

3. Material und Methoden

3.1 Methoden

3.1.1 Klinische Evaluation

Es wurden insgesamt 73 nicht miteinander verwandte Indexpatienten aus Deutschland untersucht. Die Untersuchung wurde stets nach einem etablierten Untersuchungsprotokoll für die Diagnose von familiärer DCM vorgenommen, welches Anamnese, körperliche Untersuchung, zweidimensionale und M-Modus-Echokardiographie, EKG, Herzkatheteruntersuchung und in einigen Fällen Langzeit-EKG umfasste [10, 48]. Die Diagnose der familiären DCM basierte auf Kriterien, die von der WHO sowie *Mestorni et al.* [10] vorgeschlagen wurden. Die wesentlichen Einschlusskriterien waren eine Ejektionsfraktion (EF) von $<45\%$, links ventrikuläre enddiastolische Diameter (LVEDD) von $>117\%$ an Alter und Körperoberfläche adaptiert, Ausschluss anderer Ursachen für das Vorliegen einer Dilatation wie z.B. Hypertonie, koronare Herzkrankheit, Alkoholtoxizität etc. [10], das Vorhandensein von zwei oder mehr betroffenen Personen in einer Familie oder das Vorhandensein von einem Verwandten ersten Grades eines DCM-Patienten, der an ungeklärtem plötzlichem Herztod vor dem 35. Lebensjahr verstorben ist [9]. Die Familienangehörigen eines Patienten, der im Verlauf der genetischen Analyse aufgefallen war, wurden in der Universitätsklinik in Marburg untersucht. Blutproben der DCM Patienten und der Familienangehörigen wurden jeweils in Röhrchen, die 1,6mg/ml EDTA enthielten, bei -20°C bis zur DNA-Extraktion aufbewahrt. Blut für Kontroll-DNA stammte von 400 Patienten, bei denen eine DCM ausgeschlossen war. Weiteres Blut für DNA-Proben stammte von 400 Patienten mit idiopathischer DCM.

Alle Patienten wurden vor den genetischen Untersuchungen aufgeklärt und willigten in die Untersuchungen ein. Ein entsprechendes Votum der Ethikkommissionen der Charité und der medizinischen Fakultät der Phillips-Universität Marburg lag vor.

3.1.2 Genetische Analyse

Der Ansatz dieser Untersuchung bestand darin, in einem Kollektiv von Indexpatienten mit familiärer DCM nach Mutationen im Lamin A/C-Gen zu screenen. Die DNA der Patienten wurde aus deren Blut extrahiert und bei -20°C aufbewahrt. Die weiteren Arbeitsschritte bestanden darin, zunächst definierte DNA-Fragmente des Lamin A/C Gens jedes einzelnen Patienten mittels PCR zu amplifizieren und danach mittels Direktsequenzierung nach

Mutationen und SNPs (*single nucleotide polymorphism*) zu suchen. Dabei wurden systematisch die Exons des Lamin A/C Gens, zum größten Teil einzeln und zum kleinen Teil zu Fragmenten zusammengefügt, nacheinander untersucht. Die DNA-Proben wurden direkt sequenziert. Die Sequenzen wurden dann mit der veröffentlichten Sequenz unter der Internetadresse www.ensembl.org und der Accession Nummer [OTTHUMT00000039196](http://www.ensembl.org/OTTHUMT00000039196) verglichen

Sobald eine Basenveränderung in einem Exonbereich gefunden worden war, stellte sich die Frage, ob diese eine Aminosäure veränderte oder nicht. Danach wurden die gefundenen Mutationen durch wiederholte Sequenzierungen bestätigt. Mögliche Mutationen wurden dann in einer Kontrollgruppe bestehend aus 400 Probanden auf diese Mutationen anhand Enzymverdau oder SSCP (Single Strand Conformational Polymorphism) untersucht, um festzustellen, ob es sich dabei um einen häufig vorkommenden SNP oder eine seltene Variation handelt. Im Falle einer Mutation wurde dann eine weitere Gruppe bestehend aus 400 Patienten mit idiopathischer DCM untersucht, um die Häufigkeit der identifizierten Mutation in der genannten Gruppe zu prüfen.

Tabelle 2: Methodische Vorgehensweise

PCR →	Sequenzierung →	Kontrolluntersuchung
Exonweise bzw. fragmentweise Amplifikation der DNA von 73 fDCM-Patienten	Suche nach SNPs bzw. Mutationen	Untersuchung weiterer Kontrollgruppen auf identifizierte Mutationen

Darstellung des methodischen Ablaufs der Untersuchung.

Abkürzungen: PCR, Polymerase Chain Reaction; DNA, deoxyribo nucleic acid bzw.

Desoxyribonucleinsäure; SSCP, Single Strand Conformation Polymorphism

3.1.2.1 DNA-Extraktion

Die DNA der Patienten des Kollektivs wurde mittels einer Standard-DNA-Extraktion-Methode nach Lahiri extrahiert [52]. Anders als bei anderen Techniken werden bei dieser Methode die Proteine unter Zuhilfenahme von Natriumchlorid entfernt. Der Vorteil dieser Methode besteht in einer Zeitersparnis sowie darin, dass keine toxischen Substanzen verwendet werden. Die Arbeitsschritte waren wie folgt:

1. 5ml der Blutprobe, 5ml Puffer TKM1 (10 mM Tris, pH 7,6; 10 mM MgCl₂; 2mM EDTA) und 100 µl Triton X-100 wurden vermischt und 20 min bei 2500 U/min zentrifugiert.
2. Das Pellet wurde in 800 µl Puffer TKM2 (10 mM tris, pH 7,6; 10 mM KCL; 10 mM MgCl₂; 0,4 mM NaCl; 2 mM EDTA) und 50 µl 10% SDS resuspendiert, vermischt und 10 min bei 55°C im Wasserbad inkubiert.

3. 100 µl 5 M NaCl wurden hinzu inkubiert, vermischt und 5 min bei 1200 U/min zentrifugiert. Der Überstand mit der DNA (ca. 1 ml) wurde in ein neues Gefäß überführt und mit dem doppelten Volumen reinen Alkohols (ca. 2 µl) bei Raumtemperatur vermischt. Das Gefäß wurde mehrmals gedreht, bis die DNA sichtbar wurde.
4. Die DNA wurde in ein Gefäß überführt, das 1 ml eiskaltes 70% Ethanol enthielt. Das Gefäß wurde 5 min bei 1200 U/min bei 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde 10 min in einer Vakuumzentrifuge getrocknet und in 500 µl Tris-Puffer (10 mM, pH 8,0) 15 min bei 65°C resuspendiert.
Nun konnte es als DNA-Stammlösung verwendet werden.

3.1.2.2 Polymerase-Chain-Reaction (PCR)

Die PCR ist eine vielfach verwendete Methode, um bestimmte DNA-Abschnitte zu amplifizieren. Das zu amplifizierende DNA-Fragment wird anhand zweier Primer-Oligonukleotide von etwa 20 bp Länge herausgegriffen. Sie lagern sich komplementär an bestimmte Bereiche der DNA an. Dabei wird der interessante DNA-Bereich mittels eines Vorwärts- und eines Rückwärtsprimers (*reverse-Primer*) eingekreist. Es wird also eine Arbeitslösung hergestellt, zu welcher die DNA des jeweiligen Patienten und die beiden Primer sowie des Weiteren dNTPs, Puffer, Magnesiumchlorid sowie eine thermostabile DNA-Polymerase hinzugegeben werden. Innerhalb mehrerer sich zyklisch wiederholender Arbeitsschritte, welche automatisch von einem PCR-Cycler ausgeführt werden, wird die Temperatur dieser Mischung stufenweise verändert, so dass sich das Primerannealing und die anschließende DNA-Polymerisierung kontinuierlich abwechseln. Das Primer-Design für die zu amplifizierenden Exons des Lamin A/C-Gens wurde von *Fatkin et al.* [42] veröffentlicht. Sollten die Primer beim Optimieren der PCR-Bedingungen nicht funktionieren, erfolgte das Konzipieren neuer Primer. Diese Primer sollten sich im angrenzenden Intronbereich kurz vor und kurz nach dem betreffenden Exon befinden. Allerdings sollten sie auch nicht allzu nahe am Exon sein, weil in der Sequenzierung die ersten 10-20 bp nach dem Primer oftmals schlecht zu lesen sind, und weil eventuell in der Nähe eines Exons auftretende Mutationen sich möglicherweise an funktionell bedeutsamen Intronbereichen befinden können wie z.B. Splice Stellen oder *Branch-Point-Sites*. Daher wurden Primer hergestellt, die sich meist in einem Abstand von mehr als 30-50 bp um das Exon herum anlagerten. Zu diesem Zweck wurde aus der Ensembl-Databse die zu diesem Zeitpunkt bekannte gDNA-Sequenz heruntergeladen und die Primer wurden mit dem Programm OLIGO (Version 4.06; National Biosciences, Inc, Plymouth, USA) entwickelt.

Tabelle 3: Übersicht Primer Exons 1-12

A. Vorwärtsprimer

Exon	Vorwärtsprimer
1	5'-CCCAGATCCCGAGGTCCGAC-3'
2	5'-CAGACTCCTTCTCTTAAATCTAC-3'
3	5'-CCTTCAAGTTCTTGTGTTCTGTGAC-3'
4	5'-GGCCTCCCAGGAACTAATTCTG-3'
5	5'-GCTGTAGCAGTGATGCCCAAC-3'
6	5'-GCCAGGACTATGTTTAGAGCTTG-3'
7	5'-CCCCACTTGGTCTCCCTCTCC-3'
8	5'-GAGGCCTCAATTGCAGGCAGGC-3'
9	5'-GGAGCGCTGGGGTAAGTGTC-3'
10	5'-GTAAGCAGCAGGCCGGACAAAG-3'
11	5'-CCTGAGTGGTCAGTCCCAGA-3'
12	5'-GGGGTGGCAGCTTCGGGGACAATC-3'
12	5'-CTTGTCTGAGCCCCAGACTGGAG-3'

B. Rückwärtsprimer

Exon	Rückwärtsprimer
1	5'-CCTCTCCACTCCCCGCCA-3'
2	5'-CCTAGGTAGAAGAGTGAGTGAC-3'
3	5'-CCTAGCCCAGCCCAAGTCTGTC-3'
4	5'-CTCCCTGCCACCATCTGC-3'
5	5'-CCAAAGCCCTGAGAAGTGAAG-3'
6	5'-GGTCTAGTCAAGGCCAGTTG-3'
7	5'-CCCTGATGCAGCTGTATCCCC-3'
8	5'-GAAAAGGACACTTACCCCAGC-3'
9	5'-CTGGTCCAGCAAGCAGCCAG-3'
10	5'-CACAGGAATATTCCATGGCATC-3'
11	5'-ACCTCGTCCTACCCCTCGAT-3'
12	5'-AGGGAAAAGGAAGGGAGGAGAAAT-3'

Zwecks PCR-Optimierung wurden die Primer entsprechend der Gebrauchsanweisung mit aqua dest. (aqua destillata; destilliertes Wasser) gelöst, und es wurden im Verhältnis 1:10 verdünnte Arbeitslösungen angefertigt. Sodann wurde ein Gradientencycler MJ Res. Biometra (Göttingen) benutzt, um geeignete Annealing Temperatur auszuwählen. Außerdem wurden teilweise verschiedene Primerkonzentrationen und Zyklenzahlen getestet. Wichtig ist, dass die Spezifität der Primer bei steigender Temperatur zunimmt, aber bei steigender Zyklenzahl abnimmt. Die Exons 1, 2, 3 und das Fragment 8 & 9 (bestehend aus Exons 8 und 9 mit den zugehörigen Introns) erwiesen sich als problematisch, so dass eine besondere ThermoTaq-Polymerase

(Roche, Basel) für die Exons 2 und 3 und Betain für das Exon 1 und das Fragment 8 & 9 verwendet werden musste. Beim Zusatz von Betain wurde die Menge von Aqua dest. um die Betainmenge reduziert, um das Volumen wieder auszugleichen.

Die optimierten PCR-Parameter sind in der Tab. 4 dargestellt.

Tabelle 4: Optimierte PCR-Bedingungen

Exon	Primermenge μl	Annealingtemperatur $^{\circ}\text{C}$	Zyklenzahl
1	1	67	35
2	1	56	35
3	1	61,4	35
4	1	64	35
5	1	57	35
6 & 7	1	58	35
8 & 9	1	67	35
10	1	60	35
11	1	63	35
12	1	58	35

Die Primer wurden vor der Durchführung der PCR mit den anderen Reagenzien vermischt, deren Konzentration für jedes Exon gleich war. Für die Exons 2 und 3 wurde auch ein spezieller Puffer verwendet, der mit der ThermoTaq-Polymerase (Roche, Basel) mitgeliefert worden war. Die Konzentrationen der Arbeitslösungen waren wie folgt:

Tabelle 5: Zusammensetzung eines PCR-Ansatz

Reagenzien	Exon 1 und Fragment 8 & 9 (μ l)	Restliche Exons (μ l)
Aqua dest.	14,9	17,4
10X PCR-Puffer, Appl. Biosys.	2,5	2,5
MgCl ₂ , 25 mM, Appl. Biosys.	1,5	1,5
Vorwärtsprimer, 5 pmol/ μ l; BioTeZ	1,0	1,0
Rückwärtsprimer, 5 pmol/ μ l; BioTeZ	1,0	1,0
DNTPs, 20 mM, Biozym	0,3	0,3
Amplitaq, 5 U/ μ l, Appl. Biosys.	0,3	0,3
DNA, 25 ng/ μ l	1	1
Betain, 0,5 M	2,5	

Abkürzungen: Aqua dest, destilliertes Wasser; Appl. Biosys, Applied Biosystem; MgCl₂, Magnesiumchlorid; dNTP, Desoxynukleotidtriphosphate

Alle Reagenzien bis auf die DNA wurden zunächst für das Gesamtvolumen der Patientenproben einer PCR berechnet und zu einem Mastermix vermischt. Danach wurde ein Volumen von je 24 μ l auf die einzelnen 0,2- μ l-Tubes verteilt und die DNA zuletzt hinzugegeben. Dann wurden die Tubes in einen Thermocycler (Peltier ThermoCycler. MJ Research Inc; Uno-Thermoblock, Biometra) gestellt und das Programm gestartet.

Tabelle 6: Gradienten Thermocycler-Programm für die PCR-Optimierung und Durchführung

Schritt	Temperatur ($^{\circ}$ C)	Zeit	Reaktion
1	94	4 min	Anfangsdenaturierung
2	94	30 sec	Denaturierung
3	56-67 Annealingtemp.	30 sec	Primerannealing
4	72	45 sec	Primerextention
5	Sprung nach Schritt 2, bis zu 35 Zyklen		
6	72	4 min	abschließende Primerextention
7	8	Für immer	Kühlung

Die Qualität der amplifizierten PCR-Produkte wurde mittels Agarosegelelektrophorese überprüft.

3.1.2.3 Mutationsanalyse

Mittels Direktsequenzierung wurden die amplifizierten DNA-Fragmente des Lamin A/C-Gens auf Varianten untersucht. Diese amplifizierten DNA-Fragmente beinhalteten alle 12 Exons des Lamin A/C-Gens. Vor jeder Sequenzierung erfolgte die enzymatische Aufreinigung der Proben. Anschließend wurde das Cycle Sequencing durchgeführt (s.unten).

Bei der Vorbereitung der Cycle Sequencing-Ansätze wurde je nachdem, wie lang jeweils die Introns vor und hinter einem Exon sind, entweder der *forward*-Primer oder der *reverse*-Primer des jeweiligen Exons verwendet. Beispielsweise, wenn Intron A (vor einem Exon) kleiner als Intron B (hinter einem Exon) war (siehe Tab.7), wurde der *forward*-Primer verwendet und umgekehrt wurden *reverse*-Primer verwendet. Waren die Sequenzierungsergebnisse am Beginn oder am Ende einer Sequenz unleserlich, wurden Sequenzierungen in beiden Richtungen vorgenommen. Aber auch bei Fragmentlängen von über 450 bp wurden sowohl Vorwärts als auch Rückwärts Sequenzierungen vorgenommen wie bei Exons 1, 6-7 und 8-9.

Nach dem Einstellen der benötigten Sequenzierungsprotokolle am Computer wurden die Proben innerhalb von 18 Stunden vom ABI PRISM® 3100-Avent Genetic Analyzer sequenziert. Die Sequenzen wurden gespeichert und ausgewertet.

Die Referenz-Sequenzen der jeweiligen Exons wurden schon vor Beginn der Amplifizierung aus der Ensembl Datenbank entnommen (Accession-Number [OTTHUMT00000039196](#)) und dienten als Vergleich. Auch die Länge der PCR-Produkte, der Exons und der Introns konnten anhand dieser Referenz-Sequenzen bestimmt werden. In der Tabelle 7 sind die Länge der PCR-Produkte, der Exons und der Introns dargestellt.

Tabelle 7: In der Tabelle sind die Länge des PCR-Produktes, der Exons, der Introns A (vor dem jeweiligen Exon liegend), der Introns B (hinter dem jeweiligen Exon liegend) und der zwischen 2 Exons liegenden Introns

Exon	Länge des PCR-Produktes (bp)	Länge der Exons (bp)	Länge der Introns A (bp)	Länge der Introns B (bp)	Länge der Introns zwischen 2 Exons (bp)
1	576	356	174	46	
2	268	157	43	68	
3	250	126	58	66	
4	334	171	58	105	
5	428	126	83	219	
6-7	758	221+223	177	44	93
8-9	452	108+120	104	36	74
10	458	90	122	246	
11	397	270	56	71	
12	686	27	396	263	

3.1.2.3.1 DNA Direktsequenzierung

Die Sequenzierungen wurden mit dem ABI Prism 3100 Avant-Genetic-Analyser durchgeführt. Zur Anwendung kam das BigDye® Terminator v1.1-Cycle-sequencing-kit. Dieses BigDye® Terminator-Kit enthält für die Reaktion notwendige Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs) und 4 Didesoxyribonukleosidtriphosphate (ddNTPs), die verschiedenartig fluoreszenzfarbstoff-markiert sind.

Grundlage des Verfahrens ist die Kettenabbruchmethode nach *Sanger*. Dabei wird das PCR-Produkt amplifiziert und es werden zufällig ddNTPs (Didesoxynukleosidtriphosphat) eingebaut, welche einen Kettenabbruch verursachen. In der Folge entstehen DNA-Fragmente unterschiedlicher Länge, die in jedem Ansatz stets mit dem gleichen ddNTP enden. Die vier verschiedenen Basen korrespondierten mit vier jeweils unterschiedlichen fluoreszierenden Farbstoffen (JOE, FAM, TAMRA, ROX).

Der Sequenzieransatz wird bei dem ABI 3100-Avant in einem Polyacrylamidgel unter denaturierenden Bedingungen elektrophoretisch (Kapillarelektrophorese) aufgetrennt. Anodennah wird ein Laserstrahl auf die zu detektierenden Proben gerichtet.

Das von den Fluoreszenzfarbstoffen emittierte Licht wird durch eine Optik auf ein Filtersystem (Filtersatz A bestehend aus vier Einzelfiltern: 531 nm, 560 nm, 580 nm, 610 nm) fokussiert. Die ddNTPs am Ende jedes DNA-Fragmentes zeigen dadurch Fluoreszenz unterschiedlicher Farbe und können so von einem Detektor erkannt werden. Die Daten werden von einem geschlossenen Computer mit der *ABI Sequencing Data Collection Software* in Elektropherogrammen dargestellt.

Die Arbeitsweise der automatischen DNA-Sequenzierung bestand aus folgenden Schritten:

1. Enzymatische Aufreinigung
2. Cycle-Sequencing
3. Sephadex-Aufreinigung
4. Lauf der Proben
5. Auswertung

Nachfolgend werden die oben genannten Schritte näher dargestellt.

Enzymatische Aufreinigung

Bevor das Cycle Sequencing erfolgen konnte, mussten die zu sequenzierenden PCR-Produkte in bestmöglicher Qualität vorliegen, d.h. es sollten möglichst keine Nebenbanden und Verunreinigungen wie nicht gebundene dNTPs bei der Überprüfung des PCR-Produktes in der Agarosegelelektrophorese auftreten.

Die zu sequenzierenden DNA-Proben aller 73 Indexpatienten wurden amplifiziert und auf ein 2%iges Agarosegel aufgetragen. Proben mit gut sichtbaren, sauberen Banden wurden zur Sequenzierung verwendet. Die PCR-Produkte wurden mit Exonuklease Exo I, Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP) und HPLC-Wasser (HPLC, *high performance liquid chromatography*) im Thermocycler bei 37°C für 30 Minuten und anschließend 75°C für 15 Minuten gereinigt. Bei der Verwendung von Enzymen wurde immer auf Eis gearbeitet und pipettiert. Unmittelbar danach erfolgte das Cycle Sequencing oder die Proben wurden bei -20°C tiefgefroren.

Tabelle 8: Komponenten für die enzymatische Aufreinigung

Komponente	Volumen (µl)
Exonuklease	0,09
SAP	0,32
aqua dest.	2,59
PCR-Produkt	7

Cycle-Sequencing

Die Reagenzien BigDye Terminator, 5x Sequenzierungspuffer und Primer wurden aufgetaut und in einem Mastermix mit HPLC-Wasser zusammen pipettiert. Es wurde jeweils nur ein F- oder R-Primer verwendet.

Je 8µl des Mastermixes wurden in Reaktionsgefäße überführt und 2µl des enzymatisch gereinigten PCR-Produktes hinzugegeben.

Tabelle 9: Reagenzien des Cycle Sequencing

Reagenzien	Volumen (µl)
BigDye Ready	0,5
5x Sequenzierpuffer	1,75
F oder R Primer	1
HPLC-Wasser	4,75
PCR-Produkt ger.	2

Die Reaktionsgefäße wurden verschlossen, zentrifugiert und dann in einen vorgeheizten Thermocycler gestellt, der zuvor mit dem Cycle Sequencing Programm programmiert worden war.

Tabelle 10: Thermocycler Programm für Cycle-Sequencing

Schritt	Temperatur (°C)	Zeit	Reaktion
1	96	1 min	Anfangsdenaturierung
2	96	10 sec	Zyklische Denaturierung
3	50	5 sec	Primerannealing
4	60	4 min	Primerextension
5	Sprung nach Schritt 2, 25 Zyklen		
6	8	Für immer	Kühlung

Sephadex Aufreinigung

Zur Sephadexaufreinigung wurde das Millipore MultiScreen® Assay System mit Sephadex™ G-50 Superfine verwendet. Dabei wurde zunächst Sephadex™ G-50 Superfine in die 96-Well Plates des MultiScreen® Assay System mittels einer Füllhilfe eingebracht.

Danach wurde in jedes Well 300 µl HPLC-Wasser pipettiert und 4 Stunden (bei länger als 4 Stunden wurde die Platte im Kühlschrank bei 4°C aufbewahrt) bei Raumtemperatur gelagert, um das Pulver zum Aufquellen zu bringen. Die gequollenen Platten wurden für 5 Minuten bei 1000g (g, Erdbeschleunigung) und 4°C zentrifugiert. Das abzentrifugierte HPLC-Wasser wurde verworfen. In jedes Well wurde noch mal 150 µl HPLC-Wasser pipettiert und unmittelbar danach wurde die Sephadexplatte unter gleichen Bedingungen wie im vorherigen Schritt zentrifugiert und das HPLC-Wasser verworfen. Abschließend erfolgte die Zugabe von 10 µl Sequenzierprodukt pro Well und eine letzte Zentrifugation unter den gleichen Bedingungen wie zuvor. Die gereinigten Produkte wurden in einer Sequenzierplatte aufgefangen, der zuvor mit 13 µl HiDi-Formamid (reines Formamid)/Well gefüllt worden war. Die Platte war für die Sequenzierung bereit. Die Einstellungen am Sequenziergerät wurden von einer Laborassistenten vorgenommen.

Lauf der Proben

Vor dem Start der Sequenzierung wurde zuerst ein Vorlauf des Gels für 30 Minuten ohne Proben vorgenommen. Danach Erfolgte der Auftrag der ungeraden Proben und Start der Elektrophorese. Nach 15 Minuten erfolgte die Spülung der Auftragsaschen, Auftrag der geraden Proben und Start der Elektrophorese mit Laufzeit 18 Stunden. Nach 15 Minuten wurde die Elektrophorese zum nochmaligen Spülen der Auftragsaschen kurz unterbrochen.

Auswertung

Zur Analyse der Sequenzen und zum Vergleich homologer Sequenzen wurde das Programm *Sequencher for Macintosh*, Version 4.1.2 (Gene Codes Corporation, Ann Arbor, USA) verwendet. Mit Hilfe dieses Programms können die Elektropherogramme mit der Referenzsequenz verglichen werden. Die genomische DNA des Lamin A/C-Gens wurde in das Programm geladen. Sie diente als Referenzsequenz bei der Auswertung.

3.1.2.3.2 Single-Strand-Conformational-Polymorphism (SSCP)

Das Screening mittels SSCP ist eine bewährte und sensitive Methode zur Mutationsdetektion, die auf der Konformationenbildung der DNA-Einzelstränge beruht. Die DNA wird durch Hitze denaturiert und sofort auf Eis gestellt. Dabei falten sich die Einzelstränge zusammen und bilden bestimmte Konformationen aus. Sequenzunterschiede bedingen Änderungen dieser Konformationen und daher auch des Wanderungsverhaltens in einem Gel. Wenn nun die DNA durch nicht-denaturierendes Gel wandert, machen sich diese Konformationsänderungen als verändertes Bandenmuster bemerkbar, wobei üblicherweise zusätzliche Banden auftreten, wenn man sie mit den Bandenmustern von Wildtyp-DNA vergleicht.

Man geht davon aus, dass die Sensitivität der SSCP für Mutationen bei ca. 80-90% liegt, wenn die Fragmentlänge nicht mehr als 400 bp beträgt.

Tabelle 11: Optimierte SSCP-Bedingungen der einzelnen Exons

Exon	SSCP-Bedingung
4	10% PAA, 20°C, 75 min
11	6% PAA, 20°C, 30 min

Abkürzungen: PAA, Polyacrylamidgel

Wie der Tabelle zu entnehmen ist, wurde die SSCP bei 2 Exons durchgeführt. In diesen 2 Exons wurden zuerst Mutationen durch Sequenzierung identifiziert. Da für die identifizierten Mutationen in den 2 Exons kein Restriktions-Enzym existierte bzw. durch enzymatischen Verdau ein eindeutiger Unterschied zwischen Wildtyp und Mutanten nicht zu sehen war, wie es bei dem Exon 11 der Fall war, erfolgte eine Untersuchung der Kontrollgruppe auf die Mutationen in diesen 2 Exons mittels SSCP. Dabei wurden unterschiedliche Gelkonzentrationen, unterschiedliche Temperaturen und unterschiedliche Laufzeiten benutzt.

Als Gel wurde Polyacrylamidgel verwendet. Die Polyacrylamidgele unterschiedlicher Konzentrationen wurden mittels einer Stammlösung (Roth; Acrylamid / Bisacrylamid im

Verhältnis 29:1) hergestellt. 10xTBE-Puffer setzt sich zusammen aus 60,5g Tris, 30g Borsäure und 4,65g EDTA. Diese Zutaten wurden vermischt und mit Aqua dest. auf 500 ml aufgefüllt. Die Zusammensetzung der unterschiedlichen Gelkonzentrationen findet sich in der folgenden Tabelle.

Tabelle 12: Zusammensetzung der verschiedenen Gelkonzentrationen

Gelkonzentration	Zusammensetzung	Menge
10% Polyacrylamid	10 x TBE-Lösung	1,8 ml
	40% PAA-Lösung	7,8 ml
	Aqua dest.	21,4 ml
6% Polyacrylamid	10 x TBE-Lösung	1,8 ml
	40% PAA-Lösung	4,7 ml
	Aqua dest.	24,5 ml

Abkürzungen: PAA, Polyacrylamidgel; 10xTBE besteht aus: 450 mM Tris, 450 mM Borsäure, 20 mM EDTA

Die Gießvorrichtung eines SSCP-Gels bestand aus zwei Glasplatten der Größe 26x20 cm (Amersham Bioscience). Eine der Platten hat eine Gummi-Abdichtung an den Seiten und am unteren Rand (0,5 mm dick) sowie am unteren Rand eine Reihe von 26 Slotformern aus DYMO-Kleband. Eine spezielle Plastikfolie (Gel-Fix von Serva) wurde zwischen die Glasplatten gefügt, um als Trägerfolie für das Gel zu dienen. Die Zutaten für das jeweilige Gel wurden vermischt. Es wurden zur Polymerisation 24 µl 99% TEMED und 48 µl Ammoniumpersulfat hinzugegeben. Sofort danach wurde die Gellösung zwischen die Trägerfolie und die Glasplatte mit den Slotformen gegossen. Die Polymerisation dauerte dann ca. eine Stunde. Die zu untersuchenden PCR-Produkte wurden währenddessen mit Formamidpuffer (0,9 g/ml Formamid; 10 mM NaOH; 11 mM EDTA) im Verhältnis 1:2 bzw. 1:3 gemischt. Danach erfolgte eine Denaturierung dieser Proben bei 95°C für 5 Minuten. Die Proben wurden sofort auf Eis gestellt und eine Minute lang wurde gewartet, bevor die Slots der bereits in den Elektrophoresekammern (Multiphor, Pharmacia) befindlichen und vorgekühlten Gele mit jeweils 8,5 µl der Proben beladen wurden. Ein Gellauf wurde mit 35 Watt durchgeführt. Nach dem Lauf wurden die DNA-Bandenmuster mittels Silberfärbung sichtbar gemacht (siehe Tabelle 13).

Tabelle 13: Silberfärbung eines Gels

Schritt (Lösung)	Zusammensetzung	Zeit
Fixierlösung	Eisessig 25 ml Auffüllen mit Aqua dest auf 250 ml	20 min
Waschen	Aqua dest	3 x 2 min
Silberfärbung	1% Silbernitratlösung 25 ml 37% Formaldehyd 0,25 ml Auffüllen mit Aqua dest auf 250 ml	20 min
Waschen	Aqua dest	30 sek
Entwicklung	Natriumcarbonat 6,25 g 37% Formaldehyd 0,25 ml 2% Natriumthiosulfat 0,25 ml Auffüllen mit Aqua dest auf 250 ml	bis Banden sichtbar werden
Stopplösung	Glycin 5g 0,5 M EDTA 18,8 ml Auffüllen mit Aqua dest auf 250 ml	10 min
Konservierungslösung	99,5% Glycerol 25 ml Auffüllen mit Aqua dest auf 250 ml	10 min

Zuletzt erfolgte die Trocknung der Gele auf einer vorher mit 95% Ethanol gereinigten Glasplatte, nachdem sie mit einer in Wasser gequollenen Cellophanfolie (Cotech) bedeckt und die Ränder mit Klebeband befestigt worden waren. Nach einer Trocknung von 24-48 Stunden konnten die Gele ausgeschnitten und ausgewertet werden.

3.1.2.3.3 Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus (RFLP)

Wurde in der Sequenzierung eine Mutation identifiziert, hat man versucht, ein spezifisches Enzym zur Verdauung des Fragmentes zu finden, um sowohl die Mutation zu bestätigen als auch die Kontrollgruppe auf diese Mutation zu untersuchen. Dabei wird ein Enzym benutzt, welches das betreffende PCR-Produkt auf unterschiedliche Weise schneidet, je nachdem, ob die Sequenz verändert ist oder als Wildtyp vorliegt. Im Fall der Missense-Mutation in Exon 4 wurde das Enzym *Rsa I* benutzt. Dieses schnitt das PCR-Produkt einmal an der betreffenden Stelle, wenn die mutante DNA vorlag, jedoch nicht, wenn die DNA als Wildtyp vorlag. Diese führte zur Bildung unterschiedlicher Bandenmuster, die in der Agarosegelelektrophorese identifiziert werden konnten. Die Zusammensetzung der Reagenzien für den Restriktionsenzymverdau war wie in der Tabelle 14 dargestellt ist.

Tabelle 14: Reagenzien Enzymverdau

PCR-Produkt	2 μ l
Enzym <i>Rsa I</i>	0,5 μ l
10 x BSA	1 μ l
10 x NEB-Puffer	1 μ l
Aqua dest.	5,5 μ l

Die Reagenzien wurden vermischt und bei 37°C anderthalb Stunden in den Thermocycler gestellt.

3.2 Agarosegelelektrophorese

Zur Darstellung der Bandenmuster des Enzymverdaus wie auch zur Überprüfung der Qualität sämtlicher PCR-Produkte wurden Elektrophoresen mit Agarosegelen durchgeführt. Zur Sichtbarmachung der DNA wurde das Gel mit Ethidiumbromid versetzt und nach dem Gellauf unter einer UV-Lampe betrachtet (Transluminator TI 1; Biometra). Zur Herstellung eines 2%igen Gels wurden 0,4 g Agarosepulver mit 20 ml 10 x TBE-Puffer vermischt und in einer Mikrowelle bis zum Schmelzen der Agarose vermischt. Danach wurde 1,5 μ l Ethidiumbromid in das Gel pipettiert und gut umgerührt. Das Gel wurde dann in eine Gießkammer gegossen und die Slotformer eingesteckt. Nach 20 Minuten war das Gel polymerisiert und fest.

Aufgetragen wurden pro Slot jeweils 3 μ l PCR-Produkt bzw. verdaute DNA, die mit je 3 μ l Farbstoff vermischt worden waren. Zum Größenvergleich der DNA-Fragmente wurde immer auch ein DNA-Molekulargewichtsmarker (Roche und GibcoBRL) aufgetragen.

3.3 Geräte und Chemikalien

3.3.1 Geräte

Name	Hersteller
ABI Prism 3100-Avant Genetic Analyser	Applied Biosystem
E-Centrifuge	Lab4you
Eismaschine AF – 100	Scotsman
Elektrophorese Kammer Multiphor II	Pharmacia
Enhanced Analysis System 429K (Photoanlage)	Herolab
Eppendorf Thermomixer 5436/5437	Eppendorf
Gelgießplatten	Amersham Biosciences
Horizon 58 Gelelektrophorese-Apparat	Gibco BRL
LaserJet 4000N	Hewlett Packard
Magnetrührer RCT basic	IKA Labortechnik
Metallblock – Thermostat DB-3D	Techne
Mikrowelle	AEG
Multimate 8Kanalpipette	Abimed
Optilab – Plus – System	MembraPure
Pelitier Thermal – Cycler PTC – 200	MJ Research, Inc
Pelitier Thermal – Cycler PTC – 100	MJ Research, Inc
Pipette 0,1 – 10 µl	Biohit, Eppendorf
Pipette 10 – 100 µl	Biohit, Eppendorf
Pipette 20 – 200 µl	Biohit, Eppendorf
Pipette 1000 µl	Biohit, Eppendorf
Power supply Power Pack P 25	Biometra
Power supply PS 9009 TC	Gibco BRL
PicoFuge	Stratagene
Rotanta 460R	Hettich Zentrifugen
Schüttler GFL 3015	GFL 3015
Thermocycler Uno-Thermoblock	Biometra
Thermomixer comfort	Eppendorf
Thermostat Multi Temp III	Pharmacia Biotech
T-Professional Cycler	Biometra

UV-Lampe Biometra TI 1	Biometra
Vortex REAX 2000	Heidolph
Waage Kern 510	Kern
Wassermaschine	Membra Pure

3.3.2 Materialien

Name	Hersteller
Bulldog-Klammern	Pharmacia Biotech
Cellophanfolie	Folia/Festa
FlexiClamp	Pharmacia Biotech
Gel Fix for PAG	Serva
Glasplatten	Amersham
Glaswannen	Assistant
Handschuhe Manufix sensitive	Braun
Handschuhe Nitril Rotiprotect®	Roth
Injektionsspritzen, 20ml	B Braun
MicroAmp™	Applied Biosystems
Multiscreen® Assay System	Millipore
Paket-Klebeband	Tesa
Parafilm	Roth
PCR Caps	Biozym/Brand
PCR Softstrips 0,2 ml	Biozym/Brand
Pipettenspitzen	Cotech
Reaktionsgefäße 2ml, 1,5ml, 0,6ml	Biozym
Stripette 5ml, 10ml	Costar

3.3.3 Chemikalien

Name	Hersteller
Acrylamid Rotiphorese® Gel 40	Roth
Ammoniumperoxidsulfat (APS)	Pharmacia Biotech
BigDye® Terminator-Kit v 1.1	Applied Biosystems
Betaine	Serva
Borsäure	Roth
Bromphenolblau	Pierce

EDTA	Roth
Essigsäure, 100%	Roth
Ethanol, absolute	Roth
Ethidiumbromid	Roth
Formaldehydlösung	Merck
Formamid	Merck
Glycerin	Roth
Glycin	Serva
HI-DI Formamid	Applied Biosystems
HPLC-Wasser	Roth
MDE-Gel Solution	Cambrex
Natriumcarbonat	Roth
Natriumhydroxid	Merck
Natriumthiosulfat	Merck
Polymer POP 6	Applied Biosystems
Salzsäure	Merck
SeaKem® LE Agarose	Biozym
Sephadex™ G-50 Superfine	GE Healthcare
Silbernitrat	Roth
TEMED	Serva/Pierce
Tris (base)	Roth
Xylencyanol	Pierce

4. Ergebnisse

4.1 Ergebnisse der Patientenuntersuchung

Insgesamt wurden 73 Indexpatienten mit fDCM in dieser Untersuchung erfasst. Die Indexpatienten wurden zwischen 1998 und 2006 untersucht und behandelt. Das Kollektiv bestand vorwiegend aus männlichen Patienten mit jeweils im Durchschnitt zwei betroffenen Angehörigen. Die Patienten zeigten typische Krankheitsbilder wie ausgeprägte linksventrikuläre Dilatation und Herzinsuffizienz mit Herzrhythmusstörung (in 70% der Fälle) (Tabelle 15).

Tabelle 15: Phänotyp des untersuchten Kollektivs aus 73 Patienten mit fDCM

Geschlecht	16 weiblich; 57 männlich
Alter bei Diagnosestellung	41±17 (Reichweite 3 Monate -67 Jahre)
Betroffene Angehörige	1.9±1.2 (Reichweite 1-6)
LVEDD (mm)	67±7 (Reichweite 51-79)
EF (%)	31.9±10.6 (Reichweite 6-50)
FS (%)	17.3±5 (Reichweite 7-29)
Arrhythmien*	51 (70%)

Erklärungen: Arithmetisches Mittel ± Standardabweichung

* Vorhofflimmern, Sick-Sinus-Syndrom, >1.000 VES/24h und vorimplantierter Schrittmacher oder AICD (automatischer implantierbarer Kardioverter/Defibrillator) wurden unter Arrhythmien zusammengefasst

4.2 PCR-Optimierung

Obwohl die PCR-Bedingungen für 9 von insgesamt 10 Fragmenten des Lamin A/C-Gens veröffentlicht waren [42], führten wir selbst eine Optimierung der Annealingtemperaturen für alle Fragmente durch, bis auf Exon 1 und Exon 12. Denn im Gegensatz zu den anderen Exons konnten wir bei diesen 2 Exons die veröffentlichten PCR-Bedingungen ohne weiteres anwenden. Die Optimierung erfolgte mittels eines Gradienten-Thermocyclers. Die Annealingtemperaturen lagen je nach Exon zwischen 56°C und 67°C. Während der PCR-Optimierung wurden nicht nur optimale Annealingtemperaturen gesucht, sondern auch andere Parameter wurden variiert, um ausreichend Fragmente zu amplifizieren, die frei von Nebenprodukten waren. Zu diesem Zweck wurde die PCR bei gefundener Annealingtemperatur wiederholt und dabei Zyklenzahl,

Template-, Primer- und dNTP-Menge und Zusätze variiert. Mittels Agarosegelelektrophorese wurden die Ergebnisse der Amplifikation kontrolliert und dokumentiert.

Die PCR-Optimierung wird nachfolgend beispielhaft an Exon 2, 3, 4 und 11 demonstriert.

Exon 2

Da mit den veröffentlichten PCR-Bedingungen eine optimale Amplifikation nicht erreicht werden konnte, führten wir eine Optimierung der PCR-Bedingungen durch. Mit einem Standardprogramm für Gradienten-PCR wurde die Annealingtemperatur der Primer bestimmt. Es wurde eine Temperaturspanne von 55-70°C gewählt und ein etablierter PCR-Ansatz verwendet. Zunächst wurde überprüft, ob die amplifizierte Fragmentlänge mit der, mit Hilfe der Referenzsequenz von Ensembl ermittelter Fragmentgröße von 268 bp, übereinstimmt.

Nachdem die amplifizierte Fragmentlänge mit Hilfe des Markers VIII auf die erwartete Fragmentgröße geschätzt worden war, wurde die Annealingtemperatur 56°C gewählt. Die Zyklenzahl war 35 bei einer DNA-Menge von 1 µl.

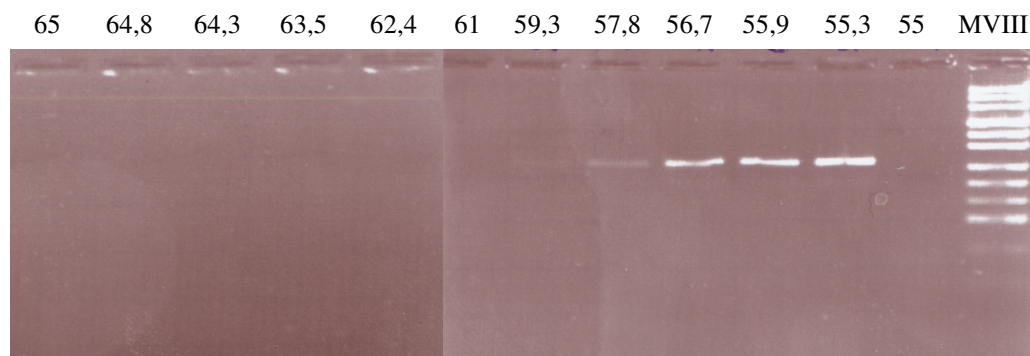


Abb.7: Ergebnis des Gradienten (T-Gradienten 55°C bis 65°C) für Exon 2 im 2%igen Agarosegel.

Da nach einer Erhöhung der Zyklenzahl, der Template- und der Primermenge nicht der gewünschte Erfolg erzielt werden konnte, wurde eine spezielle Thermo-Start-Taq-DNA-Polymerase angewendet. Zu diesem wurde ein anderes PCR-Cycler-Programm verwendet, denn die Thermo-Taq-Polymerase ist inaktiv und benötigt eine längere Inkubation bei hohen Temperaturen (95°C/10min) als Aktivierungsschritt.

Durch die Anwendung der ThermoTaq-Polymerase konnte ausreichend und ohne unspezifische Nebenbanden PCR-Produkt für den Rest der Patienten produziert werden.

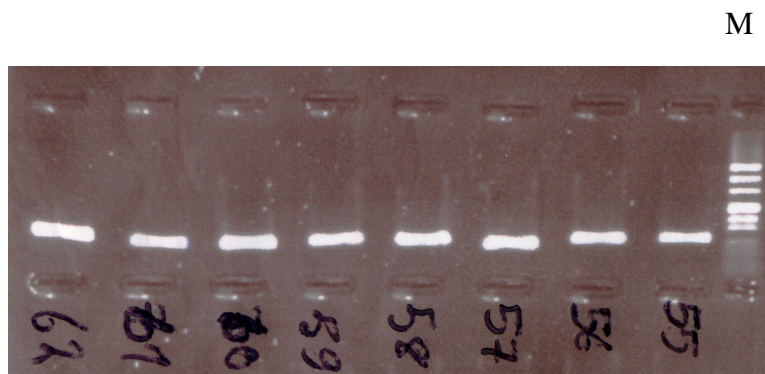


Abb.9: 8 PCR-Produkte von Patienten-DNA und Marker VIII (M) im 2%igen Agarosegel, Exon 2, nach Einsatz der Thermo-Taq-Polymerase

Exon3

Für Exon 3 wurde auch durch ein Standard-Gradienten-Programm, wie bei Exon 2 beschrieben, eine Annealingtemperatur gefunden. Es wurde eine Temperaturspanne von 55-70°C gewählt.

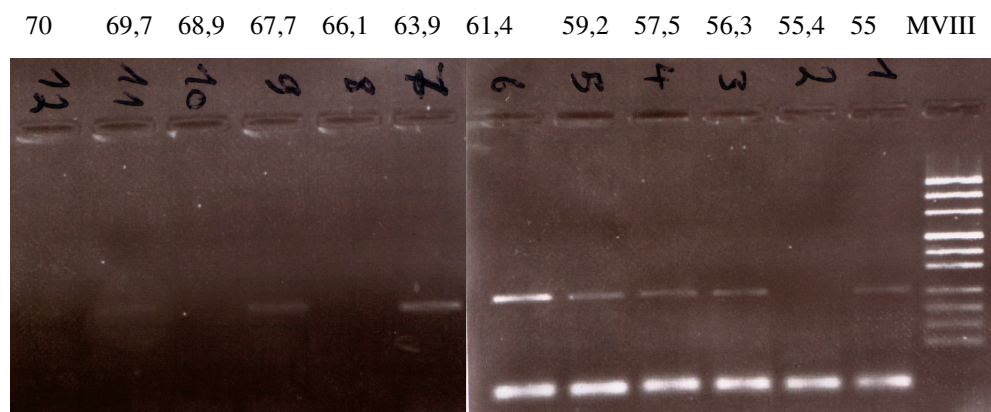


Abb.10: PCR-Produkte aus dem Gradienten-Cycler bei 55-70°C, Laufzeit 45 Min bei 82 V im 2%igen Agarosegel, Exon 3.

Das Gradientenverfahren ergab eine Annealingtemperatur von 61,4°C, bei 39 Zyklen und 1 µl DNA. Da, wie in der Abbildung 10 unter der Annealingtemperatur 61,4°C zu sehen ist, unspezifische Banden während des Gradientenverfahrens auftraten, versuchten wir mit Hilfe von Betain diesen Störfaktor zu beseitigen.

Der Einsatz von 1M (5 µl/Ansatz) Betain erbrachte uns zwar ein sauberes PCR-Produkt, aber das Amplifikationsprodukt schien nicht ausreichend zu sein. Eine Erhöhung der DNA-Template Menge von 1µl auf 1,5µl und eine Reduktion der Zyklenzahl auf 35 erbrachten uns das gewünschte Produkt.

Unter diesen Bedingungen konnte genügend PCR-Produkt ohne Nebenbanden erzeugt werden.

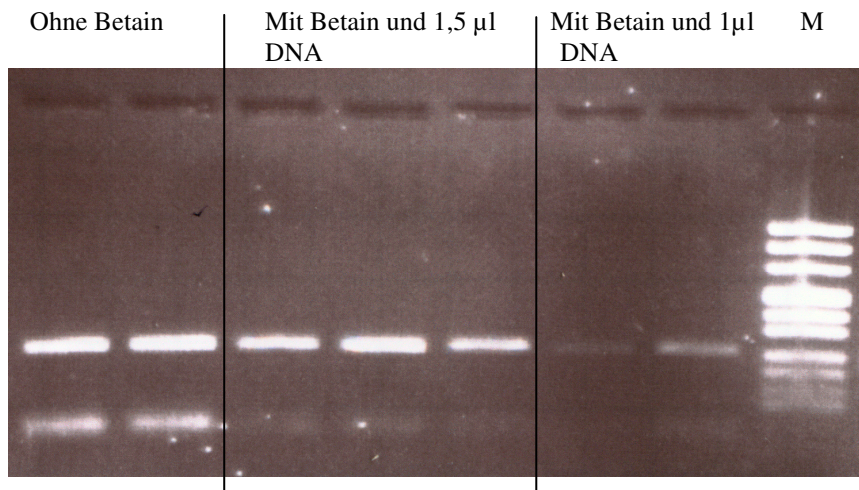


Abb.11: PCR-Produkte im 2%igen Agarosegel bei verschiedenen Bedingungen; Ohne Betain, mit Betain und Zusatz von 1µl bzw. 1,5µl DNA-Template. DNA-Molekulargewichtsmarker VIII, 2%iges Agarosegel, Exon 3

Exon 4

Bei der Durchführung des Gradienten-Programms wurde eine Temperaturspanne von 55-70°C gewählt.

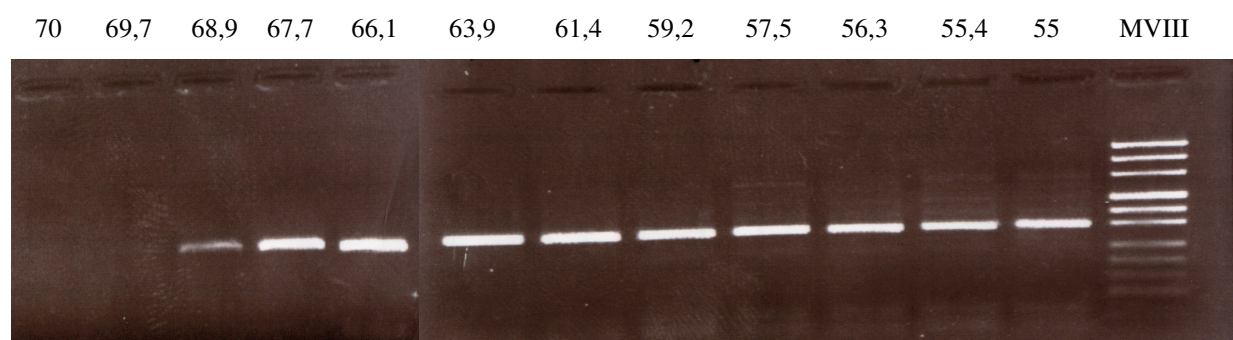


Abb.12: Ergebnis der Gradienten (Temperatur-Gradienten 55°C bis 70°C) für Exon 4 im 2%igen Agarosegel

Der Temperaturgradient ergab eine Annealingtemperatur von 64°C, bei 35 Zyklen und 1µl DNA. Da das Produkt ausreichend war und keine unspezifischen Nebenbanden auftraten, konnte auf den Zusatz von Betain verzichtet werden. Eine Veränderung des Einsatzes von 1µl DNA-Template sowie *forward*- bzw. *reverse*-Primer war nicht nötig.

Exon 11

Die PCR-Optimierung für Exon 11 erwies sich als schwierig, denn es konnte bei einer Temperaturspanne von 50-75°C und einer mehrmaligen Durchführung des Gradienten-Programms keine Annealingtemperatur ermittelt werden. Auch die für Exon 11 veröffentlichte Annealingtemperatur brachte kein Ergebnis. Aus diesem Grunde wurden über das Programm „Primer 3“ neue Primer entworfen.

Mit den Primer 11.2F und 11.2R führten wir dann erneut einen Temperaturgradienten mit der Temperaturspanne 60-70°C durch.

70 69,8 69,35 68,5 67,5 66 64,3 62,9 61,7 60,9 60,3 60 MVIII

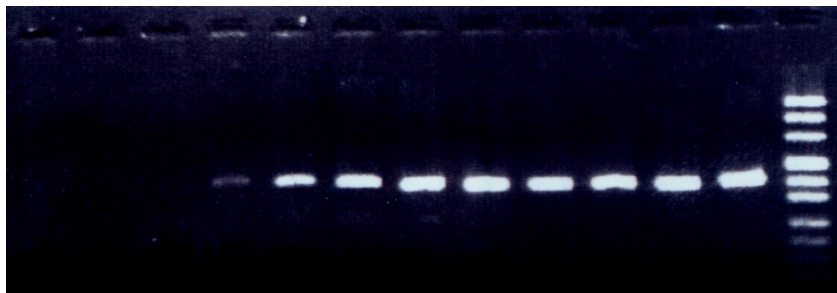


Abb.13: Temperaturgradienten für Exon 11, 2%iges Agarosegel, DNA-Marker VIII

Die Fragmentlänge in der Abbildung 13 beträgt 397 bp, was der erwarteten Fragmentgröße entspricht. Als Annealingtemperatur wurde 63°C gewählt. Da die Banden normal stark waren, d.h. genügend Produkt gebildet wurde, wurde auf einen Zusatz von Betain und eine Umstellung von anderen Parametern verzichtet.

Die Ergebnisse der genetischen Analyse werden nachfolgend aufgeführt.

4.3 Identifikation von Mutationen

Es wurden alle 12 Exons des Lamin A/C von unserem Patientenkollektiv (73 Patienten) mit familiärer DCM mittels Direktsequenzierung auf Mutationen untersucht. In den Exons 3 und 4 wurden 2 neue Mutationen, im Exon 11 eine bekannte Mutation identifiziert. Die Mutation c.608A>T im Exon 3 ist eine neue, heterozygote Missense-Mutation in einem Hotspot und führt zum Austausch von der sauren Aminosäure Glutaminsäure zu einer neutralen Aminosäure Valin im Codon 203. Die Mutation c.656A>C im Exon 4 ist ebenfalls eine neue, heterozygote Missense-Mutation, die im Codon 219 zum Austausch von der basischen Aminosäure Lysin zu der neutralen Aminosäure Threonin führt. Die Mutation c.1930C>T im Exon 11 ist eine bekannte, heterozygote Missense-Mutation und führt zum Austausch von der basischen Aminosäure Arginin zu der neutralen Aminosäure Cystein im Codon 644. In den Exons 1,3,5,7 und 10 wurde jeweils ein bekannter synonymer SNP identifiziert. Die übrigen Exons waren in der Direktsequenzierung in allen Proben unauffällig.

4.3.1 Exon 3

Nach einer sauberen Amplifikation des Exons 6 in allen 73 Patientenproben konnte eine gut auswertbare Sequenzierung mit *forward*-Primer durchgeführt werden. In einer Probe konnte ein Nukleotidaustausch in Codon 608 von A>T identifiziert werden (Abb.14). Die Variation ist in der Probennummer 4513 beobachtet worden und konnte durch nochmalige Amplifikation und eine Sequenzierung mit *reverse*-Primer bestätigt werden. Dieser Basenaustausch, der zu einem Austausch von Aminosäure Glutaminsäure zu Valin (E203V) führt, wurde in einem bekannten Hotspot (203) identifiziert.

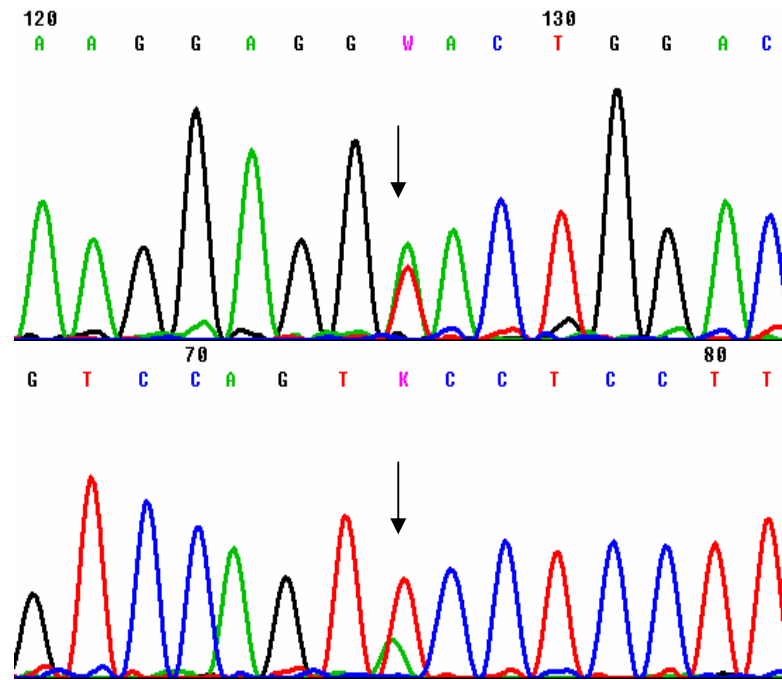


Abbildung 14: Sequenzausschnitt des Chromatogramms des Exons 3 mit F-Primer (oben) und R-Primer (unten), Probe 4513, der Pfeil kennzeichnet die heterozygote Missense-Mutation A/T

Während im Wildtyp GAA für Glutaminsäure kodiert, steht GTA in der Mutation für Valin (Tabelle 16).

Tabelle 16: Ein Vergleich der Aminosäure- und Nukleotidsequenz vom Wildtyp und der Mutation Glu203Val. Die betroffene Region im Wildtyp ist durch grüne Farbe, in der Mutation durch rote Farbe hervorgehoben.

	Wildtyp					Mutant				
Codon	201	202	203	204	205	201	202	203	204	205
Nukleotidsequenz	AAG	GAG	GAA	CTG	GAC	AAG	GAG	GTA	CTG	GAC
AS-Sequenz	---K----	E-----	E-----	L-----	D--	---K----	E-----	V-----	L-----	D--
	Lys	Glu	Glu	Leu	Asp	Lys	Glu	Val	Leu	Asp

Diese heterozygote Missense-Mutation trat in dem Kollektiv nur einmal auf. Die DNA des Bruders des Patienten wurde auf die Mutation hin untersucht und ausgeschlossen. Das Blut seiner Großcousine und seines Großcousins wurden ebenfalls untersucht und erwies sich als unauffällig. Da leider im Zeitrahmen dieser Untersuchung keine DNA weiterer Familienglieder

zur Verfügung stand, konnte keine weitere Untersuchung durchgeführt werden. Der Stammbaum ist unten dargestellt (Abb.15).

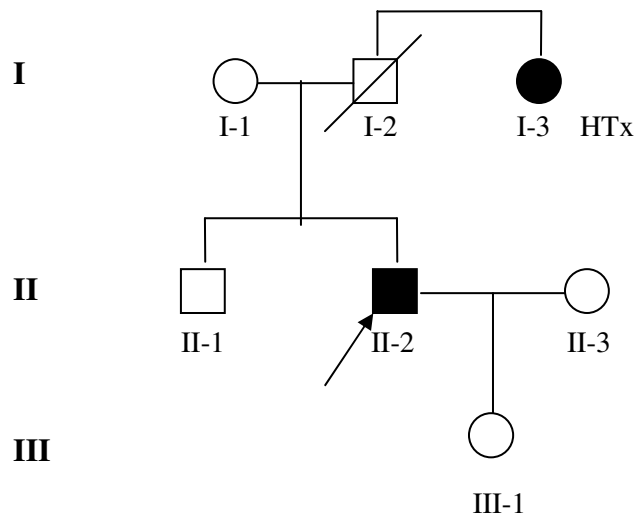


Abb.15: Familienstammbaum des Patienten 4513, Indexpatient (II-2) mit Pfeil gekennzeichnet, HTX steht für Herztransplantation, Kreise bezeichnen Frauen; Quadrate Männer, ausgefülltes Symbol steht für DCM Erkrankte, Schräglinie steht für Verstorbene

Die Mutation c.608A>T bewirkt den Austausch der sauren Aminosäure Glutaminsäure gegen die neutrale Aminosäure Valin im *coil1b* der α -helikalen *rod*-Domäne des Lamin A/C. Die Aminosäure in der betroffenen Region ist im Verlauf der Evolution hoch konserviert, was darauf schließen lässt, dass sie eine wichtige Funktion erfüllt. Tabelle 17 zeigt einen Vergleich der Aminosäuresequenz dieser Region von humanem Lamin A/C mit Sequenzen anderer Spezies.

Tabelle 17: Vergleich der AS-Sequenz in der α -helikalen *rod*-Domäne des Lamin A/C von verschiedenen Spezies im betroffenen AS-Kodon 203

Spezies	Aminosäuresequenz
Mutation E203V	LQTMKEVLD F QKN
<i>Homo sapiens</i>	LQTMKEELD F QKN
<i>Rattus norvegicus</i> (Wanderratte)	LQTLKEELD F QKN
<i>Mus musculus</i> (Maus)	LQTLKEELD F QKN
<i>Bos taurus</i> (Rind)	LQTLKEELD F QKN
<i>Xenopus tropicalis</i> (Krallenfrosch)	LQTLKEEL E FQKN
<i>Danio rerio</i> (Zebrafisch)	LQTLKEEL E FQKN
<i>Takifugu rubripes</i> (Kugelfisch)	LQTLKEEL E FQKN
<i>Aedes aegypti</i> (Stechmücke)	VQSLREEL T FKDQ
<i>Ciona intestinalis</i> (Seescheide)	LQSLKEEL E LFKEK

Eine Kontrollgruppe bestehend aus 300 Personen ohne DCM sollte auf diese Variation überprüft werden. Da ein geeignetes Restriktionsenzym zur Verfügung stand, konnte die Untersuchung mittels enzymatischem Verdau erfolgen. Um die Häufigkeit dieser Variation bei Patienten mit idiopathischer DCM einzuschätzen, wurde eine weitere Gruppe, die aus 400 Patienten mit idiopathischer DCM bestand, auf diese Variation im Exon 3 untersucht.

Das Exon 3 wurde in beiden Kontrollgruppen amplifiziert und mit dem geeigneten Restriktionsenzym verdaut.

Das Restriktionsenzym im Falle des Exons 3 war Rsa I, das in der Wildtypsequenz keine Schnittstelle besitzt. Durch die Variation Glu203Val entstand in der Mutationssequenz eine neue Schnittstelle, so dass von dem Enzym einmal geschnitten werden konnte und zwei Fragmente entstanden.

Restriktionsenzym	Isolation aus	Erkennungsstelle
Rsa I	Rhodopseudomonas sphaeroides	5'... GGT▼ACT ...3' 3'... CCA▲TGA ...5'

Bei der Auswertung über eine Gelelektrophorese konnte man sowohl das ungeschnittene als auch das geschnittene Fragment sehen (Abb.16), denn bei dieser Variation handelt es sich um eine heterozygote Mutation.

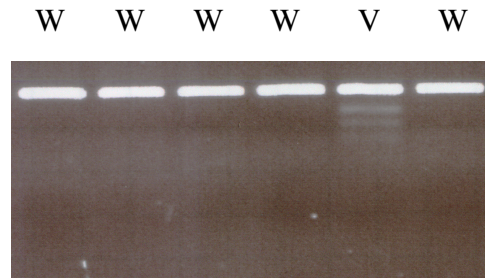


Abbildung 16: 3%iges Agarosegel mit verdauten Proben, Exon 3, W-Wildtyp, V-Variante

Die genannte Variation konnte weder in der Kontrollgruppe ohne DCM noch in der Gruppe mit idiopathischer DCM beobachtet werden.

4.3.2 Exon 4

Eine saubere Sequenzierung des Exons 4 in allen 73 Patientenproben konnte mit dem *forward*-Primer erfolgen. Die Auswertung ergab in Probe 4530 im Codon 219 ein Nukleotidaustausch von A>C. Zur Bestätigung wurde mit dem *reverse*-Primer eine Rückwärtssequenzierung durchgeführt (Abb.17).

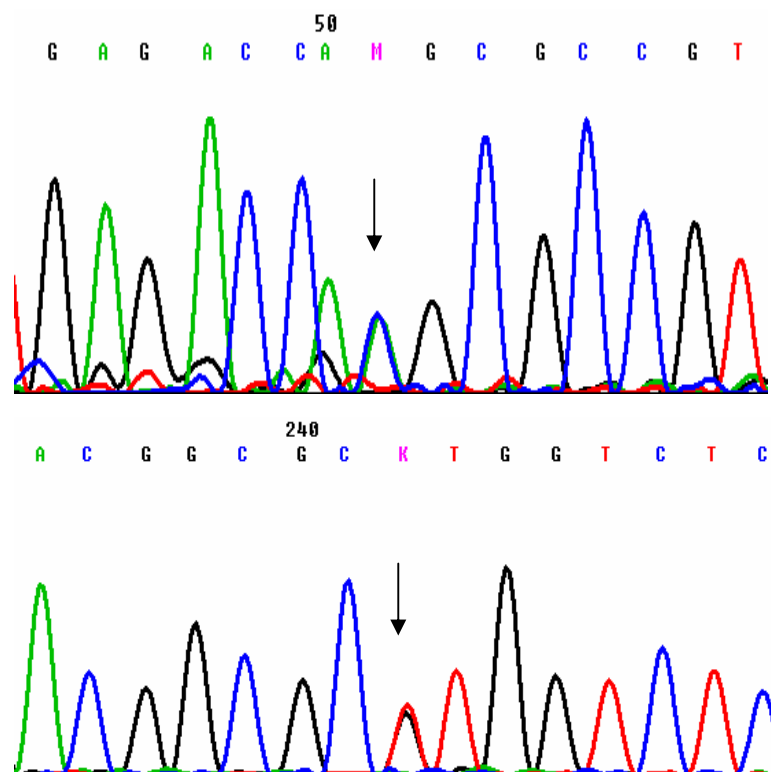


Abbildung 17: Sequenzausschnitt des Chromatogramms des Exons 4 mit F-Primer (oben) und R-Primer (unten), Probe 4530, der Pfeil kennzeichnet die heterozygote Missense-Mutation A/C

Im Gegensatz zum Wildtyp, in dem AAG für Lysin kodiert, steht in der Mutation ACG für Threonin (Tabelle 18).

Tabelle 18: Ein Vergleich der Aminosäure- und Nukleotidsequenz vom Wildtyp und der Mutation Lys219Thr. Die betroffene Region im Wildtyp ist durch grüne Farbe, in der Mutation durch rote Farbe hervorgehoben.

	Wildtyp					Mutant				
Codon	217	218	219	220	221	217	218	219	220	221
Nukleotidsequenz	GAG	ACC	AAG	CGC	CGT	GAG	ACC	ACG	CGC	CGT
AS-Sequenz	---E---	T---	K---	R---	R--	---E---	T---	T---	R---	R--
	Glu	Thr	Lys	Arg	Arg	Glu	Thr	Thr	Arg	Arg

Zur Zeit der Durchführung dieser Untersuchung stand die DNA der Schwester und des Sohnes des Indexpatienten zur Verfügung, die bei der klinischen Untersuchung unauffällig waren. Eine Erfassung weiterer Familienmitglieder des Indexpatienten war leider unmöglich. Abb.18 zeigt den Familienstammbaum des Indexpatienten.

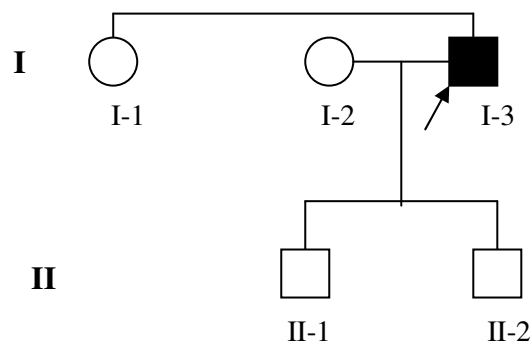


Abb.18: Familienstammbaum des Patienten 4530, Indexpatient mit Pfeil gekennzeichnet. Kreise bezeichnen Frauen, Quadrate Männer, ausgefülltes Symbol steht für DCM Erkrankte

Die Variation c.656A>C führt zu einem Aminosäuretausch Lysin zu Threonin (K219T). Dieser Austausch von einer basischen Aminosäure zu einer neutralen Aminosäure entsteht im Coil 1b der α -helikalen Domäne von Lamin A und Lamin C. Diese Variation Lys219Thr ist bisher noch nicht beschrieben worden.

Der von Mutation betroffene Bereich ist hoch konserviert in verschiedenen Spezies. Tabelle 19 zeigt einen Vergleich der Aminosäuresequenzen im Bereich der Mutation in verschiedenen Spezies.

Tabelle 19: Vergleich der AS-Sequenz in der α -helikalen *rod*-Domäne des Lamin A/C von verschiedenen Spezies im betroffenen AS-Kodon 219

Spezies	Aminosäuresequenz
Mutation K219T	EELRET T RRHETR
<i>Homo sapiens</i>	EELRET K RRHETR
<i>Rattus norvegicus</i> (Wanderratte)	EELRET K RRHETR
<i>Mus musculus</i> (Maus)	EELRET K RRHETR
<i>Bos taurus</i> (Rind)	EELRET K RRHETR
<i>Xenopus tropicalis</i> (Krallenfrosch)	EEMRET K RRHETR
<i>Danio rerio</i> (Zebrafisch)	EELRES K RRYESR
<i>Takufugu rubripes</i> (Kugelfisch)	QELREV K RRHESR
<i>Aedes aegypti</i> (Stechmücke)	QELTET K SRRQVE

Die Untersuchung des Kontrollkollektives und der Patienten mit idiopathischer DCM erfolgte mit Hilfe von SSCP-Analyse, denn ein geeignetes Restriktionsenzym stand nicht zur Verfügung. Zur Optimierung der Bedingungen wurde die SSCP-Analyse mit der Variante Lys219Thr sowie eine Negativ-Kontrolle und ein Marker (Typ VIII) unter verschiedenen Einstellungen durchgeführt. Dabei wurden Gelart, Temperatur und Laufzeit variiert, um einen möglichst deutlichen Unterschied im Laufverfahren von Variante und Kontrolle zu erhalten. Die Einstellung mit 10%igem PAA-Gel, bei 20°C und 75 Minuten wurde als optimal gewählt.

Exon 4 wurde in insgesamt 700 Proben amplifiziert und anschließend mittels SSCP-Analyse mit der Variante verglichen (Abb.19).

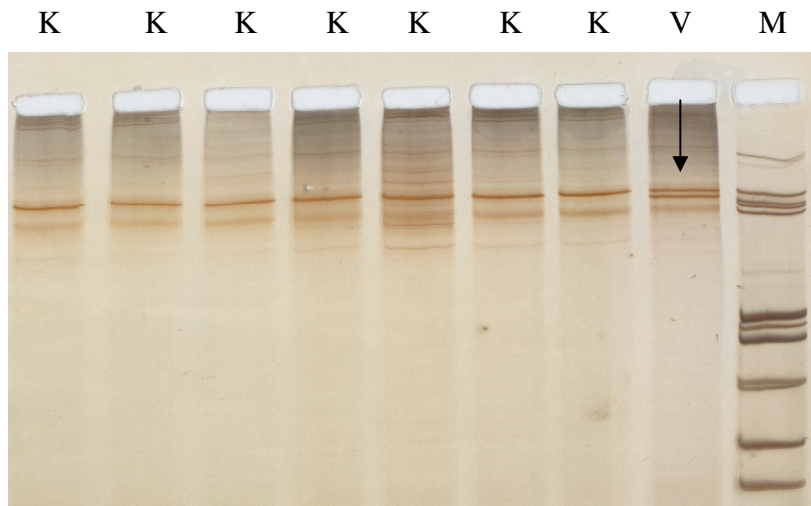


Abbildung 19: Ausschnitt aus SSCP-Gel für Variante Lys219Thr, V-Variante, K-Kontrolle. Pfeil kennzeichnet das Bandenmuster (Doppelbanden) in der Variante.

Das Bandenmuster der Variation K219T konnte in keiner der untersuchten Proben der beiden Gruppen nachgewiesen werden. Damit kann bei der Variation c.656A>C von einer krankheitsassoziierten Mutation ausgegangen werden.

4.3.3 Exon 11

Eine in allen Fällen gut auswertbare Sequenzierung konnte hier auch für alle sauber amplifizierten 73 Patientenproben erfolgen. Die Sequenzierung fand mit dem *forward*-Primer statt und das Ergebnis wurde mit Referenzsequenz aus Ensembl verglichen. In Probe 4502 wurde im Codon 1930 ein Nukleotidaustausch von C>T identifiziert (Abb.20). Die Variation wurde durch nochmalige Sequenzierung mit dem *forward*-Primer bestätigt.

Diese Missense-Mutation c.1930C>T wurde schon von anderen Arbeitsgruppen beschrieben [39].

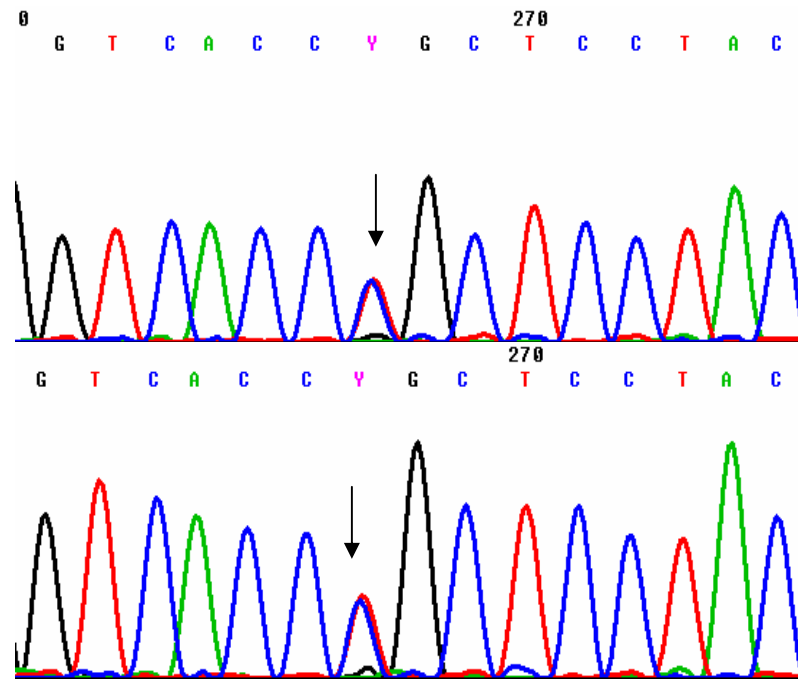


Abbildung 20: Sequenzausschnitt des Chromatogramms des Exons 11 mit F-Primer wurde zweimal zur Bestätigung sequenziert, Probe 4502, der Pfeil kennzeichnet die heterozygote Missense-Mutation C/T

Während im Wildtyp CGC für Arginin kodiert, steht in der Mutation TGC für Cystein (Tabelle 20).

Tabelle 20: Ein Vergleich der Aminosäure- und Nukleotidsequenz vom Wildtyp und der Mutation Arg644Cys. Die betroffene Region im Wildtyp ist durch grüne Farbe, in der Mutation durch rote Farbe hervorgehoben.

	Wildtyp					Mutant				
Codon	642	643	644	645	646	642	643	644	645	646
Nukleotidsequenz	GTC	ACC	CGC	TCC	TAC	GTC	ACC	TGC	TCC	TAC
AS-Sequenz	--V----	T-----	R-----	S-----	Y--	--V----	T-----	C-----	S-----	Y--
	Val	Thr	Arg	Ser	Tyr	Val	Thr	Cys	Ser	Tyr

Da uns zur Zeit dieser Untersuchung keine DNA von Verwandten des Indexpatienten zur Verfügung stand, konnte leider eine Analyse weiterer Familienmitglieder nicht erfolgen. Der Familienstammbaum ist unten dargestellt (Abb.19).

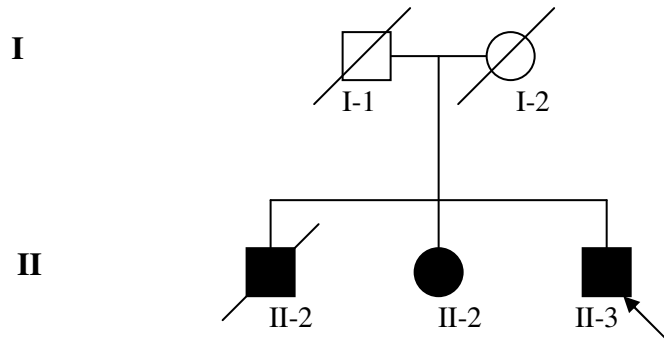


Abb.21: Familienstammbaum des Patienten 4502, Indexpatient mit Pfeil gekennzeichnet. Kreise bezeichnen Frauen, Quadrate Männer, ausgefülltes Symbol steht für DCM Erkrankte, Schräglinie steht für Verstorbene

Der Austausch von der basischen Aminosäure Arginin in der Aminosäuresequenz 644 durch die basische Aminosäure Cystein (R644C) kommt im globulären C-terminalen Ende vor und betrifft nur Lamin A. Diese von der Mutation betroffene Region ist hoch konserviert. Tabelle 21 zeigt diese hohe Konservierung durch einen Vergleich der AS-Sequenz im globulären C-terminalen Ende des Lamin A von verschiedenen Spezies.

Tabelle 21: Vergleich der AS-Sequenz im globulären C-terminalen Ende des Lamin A von verschiedenen Spezies im betroffenen AS-Codon 644

Spezies	Aminosäuresequenz
Mutation R644C	GDNLVTC SYLLGN
<i>Homo sapiens</i>	GDNLVTR RS YLLGN
<i>Rattus norvegicus</i> (Wanderratte)	GDNLVTR RS YLLGN
<i>Mus musculus</i> (Maus)	GDNLVTR RS YLLGN
<i>Bos taurus</i> (Rind)	GDSLVT RS YLLGN
<i>Xenopus tropicalis</i> (Krallenfrosch)	GESLVTR RTY IVGN
<i>Danio rerio</i> (Zebrafisch)	TEAFV SP SHFIVS

Zur Untersuchung der beiden Patientengruppen wurde die Optimierung der Bedingungen für SSCP-Analyse wie unter Exon 4 beschrieben vorgenommen. Dabei wurden Gelart, Temperatur

und Laufzeit variiert. Nach mehreren Versuchen wurde die Einstellung mit 6%igem PAA-Gel, bei 20°C und 30 Minuten gut auswertbar angenommen.

Bei allen Patientenproben (insgesamt 700 Patienten) wurde Exon 11 amplifiziert und anschließend SSCP-Analyse durchgeführt (Abb. 22).

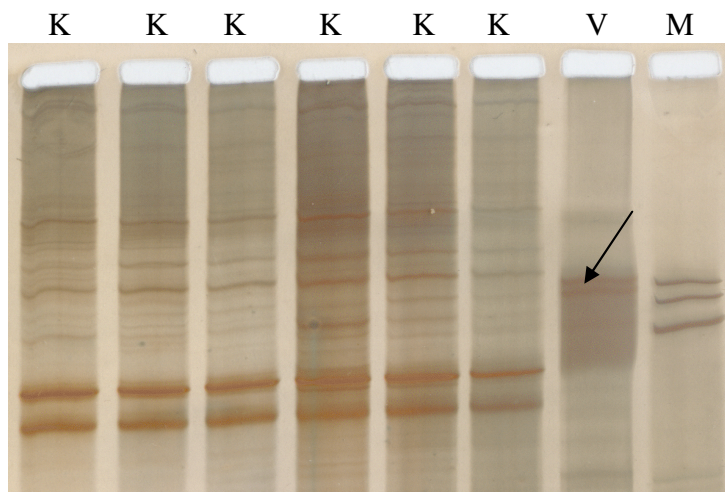


Abbildung 22: Ausschnitt aus SSCP-Gel für Variante Arg644Cys, V-Variante, K-Kontrolle. Pfeil kennzeichnet das Bandenmuster (Doppelbanden) in der Variante.

In keinem der 1400 Allele der beiden Patientengruppen konnte das für die Variante spezifische Bandenmuster gefunden werden.

4.4 Identifikation von synonymen SNPs

4.4.2 Exon 1

Da dieses Fragment 576 bp groß ist, wurden die amplifizierten DNAs von allen 73 Patienten sowohl vorwärts als auch rückwärts sequenziert.

In einer Probe konnte ein Nukleotidaustausch c.51C>T im Codon 17 identifiziert werden. Da im Wildtyp AGC die Aminosäure Serin kodiert und in der identifizierten Variante AGT ebenfalls die Aminosäure Serin kodiert, kam es zu keinem Aminosäureaustausch. Damit ist dieser heterozygote SNP (Ser17Ser) synonym. Dieser SNP kam nur bei einem Patienten vor (1,36% des Kollektives) und ist schon beschrieben worden (Database-Nr.: rs11549668).

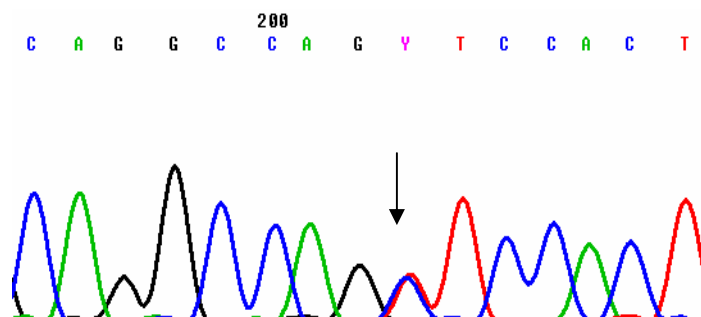


Abbildung.20: Sequenzausschnitt des Chromatogramms des Exons 1 mit F-Primer, Probe 4523. Der Pfeil kennzeichnet den heterozygoten SNP C/T.

Tabelle 22: Ein Vergleich der AS-Sequenz und der Nukleotidsequenz bei Wildtyp und SNP Ser17Ser. Die betroffene Region im Wildtyp ist durch grüne Farbe, im SNP durch rote Farbe hervorgehoben.

	Wildtyp					SNP				
Codon	15	16	17	18	19	15	16	17	18	19
Nukleotidsequenz	CAG	GCC	AGC	TCC	ACT	CAG	GCC	AGT	TCC	ACT
AS-Sequenz	--Q----	A-----	S-----	S-----	T--	--Q----	A-----	S-----	S-----	T--
	Gln	Ala	Ser	Ser	Thr	Gln	Ala	Ser	Ser	Thr

4.4.2 Exon 3

Dieses Exon konnte bei allen 73 Indexpatienten sauber amplifiziert und anschließend mit dem *forward*-Primer gut lesbar sequenziert werden. Bei der Auswertung und dem Vergleich mit der Referenzsequenz wurden bei 2 Patienten (2,7% des Kollektives) ein heterozygoter Nukleotidaustausch c.824G>A festgestellt. Diese Variation ist ein synonymer Polymorphismus, denn sowohl CTG im Wildtyp als auch CTA in den Patienten kodieren für Leucin (Leu204Leu). Das Triplet CTG befindet sich direkt neben dem oben beschriebenen Hotspot, in dem im Rahmen dieser Untersuchung eine Mutation identifiziert wurde. Dieser synonyme SNP ist bekannt und ist bei NCBI unter der Database-Nr. rs12117552 beschrieben.

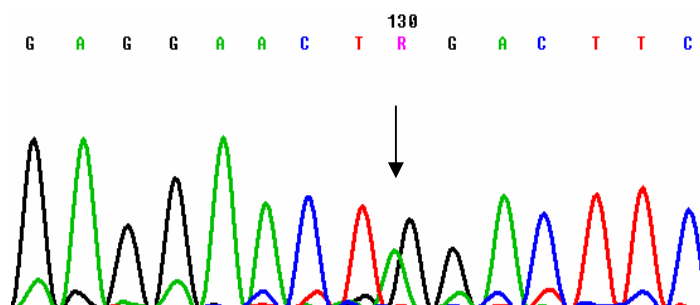


Abbildung.21: Sequenzausschnitt des Chromatogramms des Exons 3 mit F-Primer, Probe 3981. Der Pfeil kennzeichnet den heterozygoten SNP G/A.

Tabelle 23: Ein Vergleich der AS-Sequenz und der Nukleotidsequenz bei Wildtyp und SNP Leu204Leu. Die betroffene Region im Wildtyp ist durch grüne Farbe, im SNP durch rote Farbe hervorgehoben.

	Wildtyp					SNP				
Kodon	202	203	204	205	206	202	203	204	205	206
Nukleotidsequenz	GAG	GAA	CTG	GAC	TTC	GAG	GAA	CTA	GAC	TTC
AS-Sequenz	---E---	E---	L---	D---	F--	---E---	E---	L---	D---	F--
	Glu	Glu	Leu	Asp	Phe	Glu	Glu	Leu	Asp	Phe

4.4.3 Exon 5

Die sauber amplifizierten Proben aller Indexpatienten konnten mit dem *forward*-Primer sequenziert werden. Die Ergebnisse der Sequenzierung wurden mit der Referenzsequenz verglichen und mit dem Programm Sequencher ausgewertet.

Ein Nukleotidaustausch von T>C im Codon 287 wurde in 9 Proben (12,3% des Kollektives) identifiziert. Sowohl das Triplet GCT als auch das Triplet GCC kodieren für die Aminosäure Alanin. Es handelt sich somit um einen synonymen SNP (Ala287Ala), der schon beschrieben und bei NCBI unter Database-Nr. rs538089 veröffentlicht ist. Dieser SNP kommt bei allen 9 Patienten in heterozygoter Form vor.

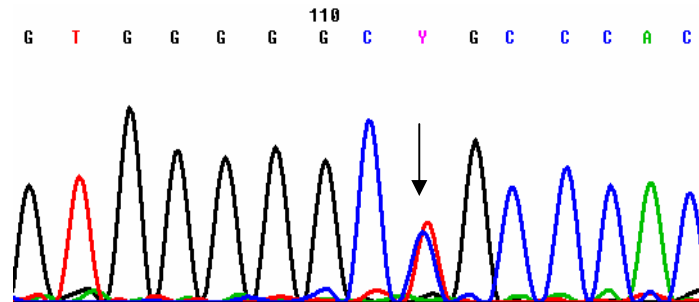


Abb.22: Sequenzausschnitt des Chromatogramms des Exons 5 mit F-Primer, Probe 3021. Der Pfeil kennzeichnet den heterozygoten SNP T/C.

Tabelle 24: Ein Vergleich der AS-Sequenz und der Nukleotidsequenz bei Wildtyp und SNP Ala 287Ala. Die betroffene Region im Wildtyp ist durch grüne Farbe, im SNP durch rote Farbe hervorgehoben.

	Wildtyp					SNP				
Kodon	285	286	287	288	289	285	286	287	288	289
Nukleotidsequenz	GTG	GGG	GCT	GCC	CAC	GTG	GGG	GCC	GCC	CAC
AS-Sequenz	--V----	G-----	A-----	A-----	H---	--V----	G-----	A-----	A-----	H---
	Val	Gly	Ala	Ala	His	Val	Gly	Ala	Ala	His

4.4.4 Exon 7

Dies Exon zusammen mit dem Exon 6 wurden als ein Fragment mit dem *forward*-Primer des Exons 6 und dem *reverse*-Primer des Exons 7 amplifiziert. Daraus ergab sich eine Fragmentlänge von 758 bp. Deshalb erfolgte die Sequenzierung in beiden Richtungen, d.h. die Sequenzierung wurde sowohl mit dem *forward*-Primer des Exons 6 als auch mit dem *reverse*-Primer des Exons 7 durchgeführt. Dadurch konnten gut lesbare Ergebnisse erzielt und mit hoher Sicherheit Variationen erkannt werden.

Dabei wurde bei 9 Patienten (12,3% des Kollektivs) ein Nukleotidaustausch von T>C im Codon 446 festgestellt, der nicht zu einem Aminosäureaustausch führt (Asp446Asp). Dieser synonyme SNP kommt in allen 9 Proben in heterozygoter Form vor und ist schon beschrieben worden (Database-Nr.: rs505058).

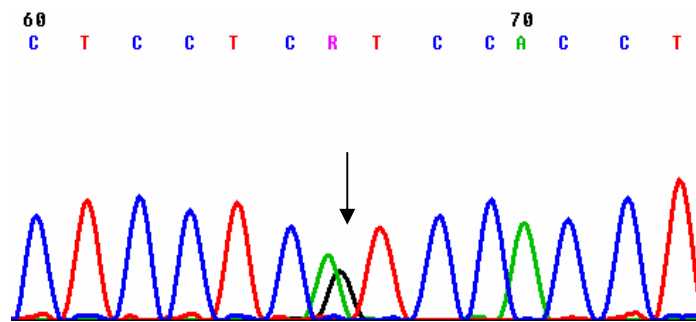


Abbildung.23: Sequenzausschnitt des Chromatogramms des Exons 7 mit R-Primer, Probe 3069. Der Pfeil kennzeichnet den heterozygoten SNP T/C.

Tabelle 25: Ein Vergleich der AS-Sequenz und der Nukleotidsequenz bei Wildtyp und SNP Asp446Asp. Die betroffene Region im Wildtyp ist durch grüne Farbe, im SNP durch rote Farbe hervorgehoben.

	Wildtyp					SNP				
Kodon	444	445	446	447	448	444	445	446	447	448
Nukleotidsequenz	GAG	GTG	GAT	GAG	GAG	GAG	GTG	GAC	GAG	GAG
AS-Sequenz	--E----	V----	D----	E-----	E--	--E----	V----	D----	E-----	E--
	Glu	Val	Asp	Glu	Glu	Glu	Val	Asp	Glu	Glu

4.4.5 Exon 10

Dies Exon wurde problemlos und sauber in allen Patientenproben amplifiziert und anschließend sequenziert. Es wurde ein Nukleotidaustausch von C>T im Kodon 566 identifiziert. Da sowohl CAC in der Referenzsequenz als auch CAT im SNP für Histidin kodieren, kam es zu keinem Aminosäureaustausch. Somit handelt es sich dabei um einen synonymen SNP, der schon beschrieben worden ist (Database-Nr.: rs4641).

Dieser synonyme SNP lag bei 3 Patienten in homozygoter und bei 31 Patienten in heterozygoter Form vor (insgesamt 46,5% des Kollektivs).

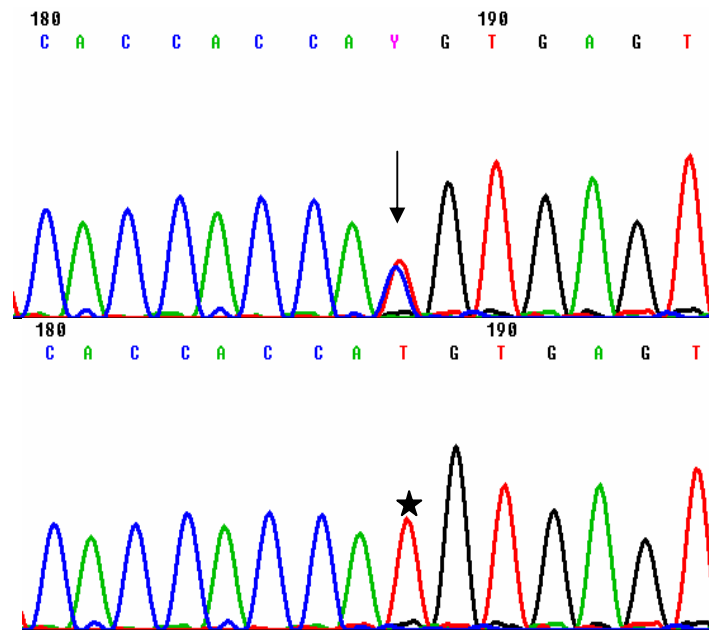


Abbildung.24: Sequenzausschnitte des Chromatogramms des Exons 7 mit R-Primer. Der Pfeil kennzeichnet den heterozygoten (oben, Probe 3228), der Stern kennzeichnet den homozygoten (unten, Probe 3735) SNP C/T.

Tabelle 26: Ein Vergleich der AS-Sequenz und der Nukleotidsequenz bei Wildtyp und SNP His566His. Die betroffene Region im Wildtyp ist durch grüne Farbe, im SNP durch rote Farbe hervorgehoben

	Wildtyp					SNP				
Kodon	564	565	566	567	568	564	565	566	567	568
Nukleotidsequenz	CAC	CAC	CAC	GTG	AGT	CAC	CAC	CAT	GTG	AGT
AS-Sequenz	--H----	H----	H----	V-----	S--	--H----	H----	H----	V-----	S--
	His	His	His	Val	Ser	His	His	His	Val	Ser

4.5 Exons ohne SNP

Die Exons 2, 6, 8, 9 und 12 wurden sauber amplifiziert und anschließend sequenziert. Exon 2 konnte in allen 73 Patientenproben mit dem *forward*-Primer gut auswertbar sequenziert werden. Exon 6 und Exon 7 wurden als ein Fragment mit dem *forward*-Primer des Exons 6 und mit dem *reverse*-Primer des Exons 7 amplifiziert und in beiden Richtungen sequenziert. Exon 8 zusammen mit Exon 9 wurden wie Exons 6-7 als ein Fragment amplifiziert und in beiden Richtungen sequenziert. Exon 12 ließ sich sauber amplifizieren und anschließend mit dem *forward*-Primer sequenzieren.

Bei der Auswertung der Sequenzierergebnisse aller oben beschriebenen Exons wurden keine Variationen gefunden.

4.6 Familien

Bei dem Indexpatienten mit der Mutation c.608A>T wurde im Alter von 48 Jahren (2002) die Diagnose DCM gestellt und ein DDD-PM (DDD-Schrittmacher) implantiert. Die Tochter und der Bruder des Patienten sind klinisch unauffällig. Die Daten und DNA-Probe von der herztransplantierten Tante des Patienten standen leider nicht zur Verfügung. Aber während der Durchführung dieser Untersuchung konnte eine genetische Analyse bei dem Bruder, dem Großcousin (mit Borderline DCM) und der Großcousine (klinisch unauffällig) des Patienten durchgeführt werden. Die Analyse war jedoch unauffällig. Interessant für die Untersuchung wären die DNA-Proben von der Tante (Zustand nach HTX) oder den Eltern des Indexpatienten gewesen. Durch eine genetische Analyse der Eltern des Patienten könnte man eine neu aufgetretene Mutation ausschließen bzw. erkennen.

Die Diagnose DCM und Rhythmusstörung wurde bei dem Indexpatienten mit der Mutation c.656A>C im Alter von 44 Jahren (2005) gestellt. In demselben Jahr der Diagnosestellung wurde ebenfalls die Indikation zur DDD-PM Implantation gestellt. Die DNA-Proben von der klinisch unauffälligen Schwester und von einem der ebenfalls klinisch unauffälligen zwei Söhne wurden auf die identifizierte Mutation untersucht, die jedoch unauffällig waren. Zwei Onkel des Patienten und ebenfalls die Mutter, die Schrittmacher-Patientin war, sind an unklarer Herzerkrankung verstorben. Weitere Daten bzw. DNA-Proben von diesen drei Angehörigen, die sehr aufschlussreich für diese Untersuchung wären, lagen uns nicht vor.

Bei dem Patienten mit der Mutation c.1930C>T wurde die Diagnose DCM im Alter von 52 Jahren (1995) gestellt. Interessanterweise hatte der Patient keine Rhythmusstörung. Die Schwester des Patienten erkrankte mit 55 Jahren an DCM und entwickelte mit 62 Jahren Herzrhythmusstörungen, die zur PM-Implantation führten. Ein Bruder des Patienten erkrankte wahrscheinlich schon vor dem 56. Lebensjahr. Dieser entwickelte keine Herzrhythmusstörung und ist im Alter von 56 Jahren an dekompensierter Herzinsuffizienz verstorben. Ein weiterer Bruder des Indexpatienten ist klinisch unauffällig. Eine genetische Analyse bei den Familienangehörigen des Indexpatienten war zur Zeit der Durchführung dieser Untersuchung nicht möglich, da DNA-Proben von ihnen nicht zur Verfügung standen.

4.7 Zusammenfassung der Ergebnisse

In der Tabelle 27 und in der Abb.25 sind alle Ergebnisse der genetischen Analyse zusammengefasst.

Tabelle 27: Variationen in den 12 Exons des Lamin A/C-Gens bei 73 untersuchten Patienten mit fDCM

Mutation oder SNP	n	Exon	Nukleotid-austausch	Aminosäuren-austausch	neu oder bekannt
Mutation	1	3	c.608A>T	Glu 203 Val	neu
Mutation	1	4	c.656A>C	Lys 219 Thr	neu
Mutation	1	11	c.1930C>T	Arg 644 Cys	bekannt
Syn. SNP	1	1	c.51C>T	Ser 17 Ser	rs11549668
Syn. SNP	2	3	c.824G>A	Leu 204 Leu	rs12117552
Syn. SNP	9	5	c.1073T>C	Ala 287 Ala	rs538089
Syn. SNP	9	7	c.1550T>C	Asp 446 Asp	rs505058
Syn. SNP	34	10	c.1910C>T	His 566 His	rs4641

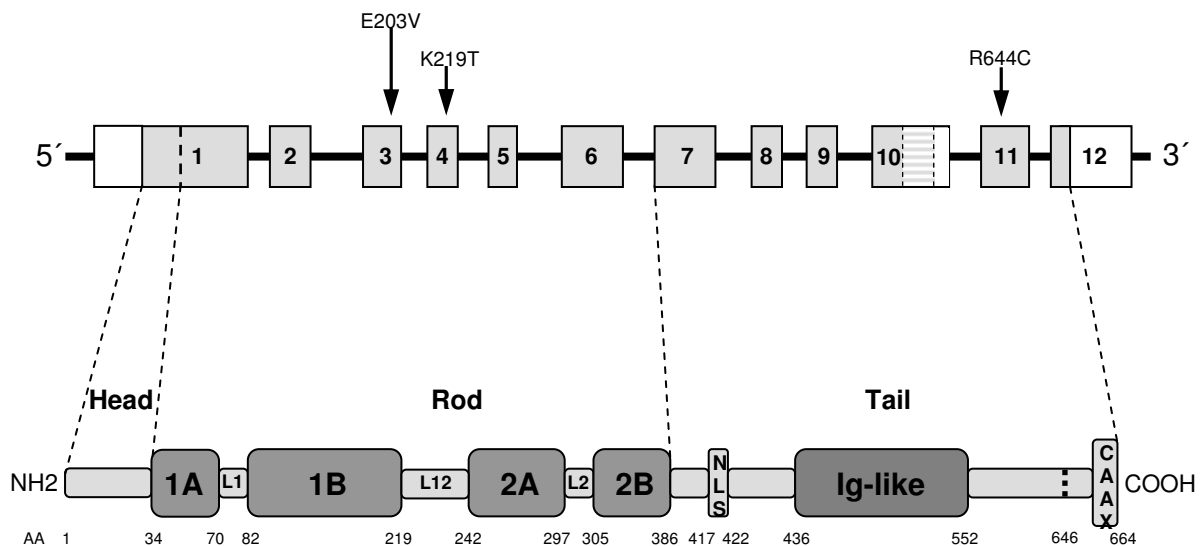


Abbildung 25: Die Abbildung zeigt die Lokalisationen aller in dieser Untersuchung identifizierten Mutationen in den Exonen des Lamin A/C-Gens und die betroffenen Regionen des Lamin A/C-Proteins. Modifiziert nach *Perrot et al. 2008*

5. Diskussion

5.1 Überblick

Das Ziel dieser Arbeit war eine Untersuchung von Patienten mit fDCM auf Mutationen im Lamin A/C Gen und die Prüfung der phänotypischen Ausprägung der identifizierten Mutationen. Im Rahmen dieser Untersuchung wurden alle 12 Exons des Lamin A/C von 73 Indexpatienten mit fDCM untersucht. Drei heterozygote Missense-Mutationen wurden in drei nichtverwandten Patienten identifiziert. Eine neue Mutation in Exon 3 in einem Hotspot, eine weitere neue Mutation in Exon 4 und schließlich eine bekannte Mutation in Exon 11. Außerdem wurden fünf bekannte synonyme SNPs in den Exons 1, 3, 5, 7 und 10 identifiziert.

5.2 Methoden

Die genetische Analyse des LMNA Gens in allen 73 Indexpatienten wurde mittels der sensitivsten und effizientesten Methode des Mutationsscreenings, nämlich der automatischen Sequenzierung, durchgeführt. Die Genauigkeit der Basenerkennung anhand ABI Prism 3100 beträgt 98,5% für die Fragmente zwischen 27 und 576 bp [53]. Wir konnten anhand unserer Untersuchungen feststellen, dass der in einer Richtung sequenzierte Lesebereich zwischen 30 und 400 bp mit einer sehr hohen Spezifität und Sensitivität ausgewertet werden konnte. In unserer Analyse lagen alle Lesebereiche (Exons), bis auf 2 Fragmente, zwischen 43 und 326 bp. Bei diesen 2 Fragmenten handelte es sich um Exon 1, das 576 bp lang war, und das Fragment 6-7, das aus 2 Exons bestand und 758 bp lang war. Diese 2 Fragmente wurden sowohl mit *forward*- als auch mit *reverse*-Primer sequenziert, um eine Spezifität und Sensitivität wie bei den anderen Fragmenten zu erreichen.

5.3 Prävalenz der Mutationen im LMNA Gen

Etwa 30% aller DCM-Fälle ist familiär bedingt. Als Krankheitsgen für DCM sind bisher mehr als 20 verschiedene Gene beschrieben worden. Ein wichtiges Gen davon ist Lamin A/C Gen, dessen Mutationen für etwa 8% der DCM-Fälle verantwortlich gemacht werden [4, 11, 15]. Wie wir anhand unserer Untersuchung zeigen können, wird diese Häufigkeit nicht von allen Arbeitsgruppen angegeben. Die Häufigkeit der Lamin A/C-Mutationen, die in 649 Probanden mit DCM zwischen 1999 und 2006 identifiziert worden sind, beträgt ca. 5% [54]. Im Rahmen unserer Untersuchung wurden 3 Mutationen in 3 nichtverwandten Indexpatienten in einem

Kollektiv, bestehend aus 73 Indexpatienten mit gesicherter fDCM, identifiziert. Dies entspricht einer Häufigkeit von 4,1%.

Es ist wichtig zu erwähnen, dass die bisher untersuchten Patientenkollektive nicht mit dem von uns untersuchten Kollektiv zu vergleichen sind. Denn unter den 649 untersuchten Patienten sind sowohl idiopathische als auch familiäre DCM-Patienten. *Taylor et al.* [11] untersuchten 49 Indexpatienten von den oben genannten 649 Probanden. 40 Patienten hatten fDCM und 9 Patienten hatten sporadische DCM. In 3 fDCM-Patienten wurden 3 Mutationen und in einem sporadischen DCM-Patienten 1 Mutation im Lamin A/C-Gen identifiziert. *Hermida-Prieto et al.* [55] untersuchten 67 ebenfalls von den oben erwähnten 649 Patienten, wovon 18 gesicherte fDCM, 17 mit fraglicher DCM und 32 sporadische DCM Patienten waren. Die Arbeitsgruppe identifizierte 2 Mutationen im Lamin A/C-Gen bei den fDCM Patienten. Ein großes Patientenkollektiv wurde von *Parks et al.* [56] untersucht. Dieses bestand aus 324 DCM-Patienten, wovon 187 fDCM-Patienten waren. Sie identifizierten bei 7,5% (14 Patienten) der fDCM-Fälle Mutation im LMNA Gen. Diese verschiedenen Häufigkeiten beruhen wahrscheinlich auf Unterschieden in der Patientenselektion oder Herkunft der untersuchten Patienten. Somit ist ein direkter Vergleich zwischen der von uns bestimmten Häufigkeit und den von anderen Gruppen bestimmten Häufigkeiten nicht ohne weiteres möglich.

Da uns zur Zeit dieser Untersuchung DNA nur von einer eingeschränkten Anzahl an Angehörigen der Indexpatienten zur Verfügung stand, konnten wir leider keine Aussage darüber treffen, mit welcher Häufigkeit die Mutationen in den Familienangehörigen vorkommen. Insgesamt wurden 5 Familienmitglieder der Indexpatienten auf Mutationen untersucht und sie waren unauffällig.

Die identifizierten Mutationen mit einer Häufigkeit von 4,1% zeigen, dass Mutationen im Lamin A/C-Gen bei Patienten mit fDCM eine klinische Relevanz haben.

5.4 Die identifizierten Mutationen

Die Mutation c.608A>T im Exon 3 ist bisher noch nicht beschrieben worden und liegt in einem Hotspot, d.h. in derselben Position wurden bisher 2 Mutationen identifiziert. Anders als unserer Befund, in dem die Mutation zum Aminosäureaustausch Glutaminsäure zu Valin (E203V) führt, führt die Mutation c.608A>G, die von *Jakobs et al.* [42] beschrieben worden ist, zum Aminosäureaustausch von Glutaminsäure zu Glycin (E203G). Die andere Mutation c.607G>T, die von *Fatkin et al.* [45] beschrieben worden ist, führt zum Aminosäureaustausch von Glutaminsäure zu Lysin (E203K). Damit ist die in dieser Untersuchung identifizierte Mutation

E203 die dritte Mutation, die bisher in demselben Aminosäurecodon des Lamin A/C beschrieben worden ist. Dies zeigt, dass die DNA in dieser Position für Basenaustausch-Mutation anfällig ist. Während die Mutation c.656A>C im Exon 4 eine ebenfalls noch nicht beschriebene Mutation ist, ist die Mutation c.1930C>T im Exon 11 eine bekannte Mutation. Diese bekannte Mutation wurde von *Speckmann (errata) et al. 2000b* und *Genschel et al. 2000* [39] beschrieben.

Alle 3 Mutationen scheinen krankheitsrelevant zu sein, denn wir konnten zum einen diese Mutationen in 300 Probanden (600 Allele) ohne DCM und in 400 Patienten (800 Allele) mit idiopathischer DCM nicht finden. Dadurch konnten wir ausschließen, dass es sich bei diesen Varianten um seltene Polymorphismen handelt, da diese Variante in den 2 genannten Kollektiven nicht vorkommt. Zum anderen betreffen die Mutationen ein in der Evolution streng konserviertes Kodon, was dafür spricht, dass dieser Bereich eine wichtige Funktion erfüllt. Auch der Phänotyp des betroffenen Patienten ist identisch mit den Phänotypen der bisher von anderen Autoren beschriebenen Mutationen im Lamin A/C, nämlich linksventrikuläre Dilatation, eingeschränkte Pumpfunktion und Reizleitungsstörungen [39, 42, 45, 48, 57].

5.5 Phänotypische Auswirkungen der Mutationen im Lamin A/C-Gen

Alle im Rahmen dieser Untersuchung identifizierten Mutationen sind heterozygote Missense-Mutationen (Basenaustausch-Mutationen). Es ist sehr wahrscheinlich, dass die Mutationen einen dominanten Effekt ausüben. Dieses Ergebnis bestätigt die Tatsache, dass bei mehr als 60-70% der fDCM Fälle ein autosomal-dominanter Erbgang vorliegt [16].

Anhand dieser Untersuchung und anderer Studienergebnisse [16, 58] kann die Auffassung von Taylor et al. [11] nicht bestätigt werden, dass bei der autosomalen familiären DCM das weibliche Geschlecht dominiert. Alle drei Mutationen in dieser Untersuchung wurden in drei männlichen Patienten identifiziert.

Die Missense-Mutationen E203V und K219T betreffen die Domäne Coil 1b im α -helikalen *Rod* des Lamin A und C. Bei den Patienten mit den oben genannten Mutationen ist das klinische Erscheinungsbild identisch mit dem, was bisher von anderen Autoren im Zusammenhang mit Mutationen in der *rod*-Domäne des Lamin A und C beschrieben worden ist [11, 44, 45, 48]. Anhand dieser Untersuchung und der Patientendaten konnte die Feststellung von Taylor et al. nicht bestätigt werden, dass Anzeichen für Muskelabnormalitäten wie erhöhte Kreatininkinase (CK) im Blut, milde Symptome von Muskeldystrophien oder eine positive Familienanamnese für Skelettmuskelerkrankungen als Prädiktor bei Trägern von LMNA Mutationen angesehen werden können. Denn die Patienten mit den beschriebenen Mutationen in unserer Untersuchung wiesen keinerlei Anzeichen für Skelettmuskelabnormalitäten auf. Auch die Familienanamnese ist in

dieser Hinsicht negativ aufgefallen. Die klinischen Daten von den Patienten sprechen eher dafür, dass das Vorhandensein von AV-Blockierungen (AVB) in Kombination mit DCM als Prädiktor angesehen werden könnte. In dem gesamten Kollektiv von 73 Patienten wiesen 4 Patienten (5,5% des Kollektivs) AVB III. Grads auf, wovon 50%, d.h. 2 Patienten, Mutationen in der *rod*-Domäne des Lamin A/C aufwiesen. *Arbustini et al.* [43] untersuchten ein Patientenkollektiv (n=73) auf Mutationen im Lamin A/C-Gen und identifizierten 5 Mutationen. Diese Mutationen wurden in 5 von insgesamt 15 Patienten mit AVB im gesamten Kollektiv identifiziert. Diese Untersuchung zeigt ebenfalls wie unsere Untersuchung, dass etwa 30-50% der DCM-Patienten mit AVB Mutationen im Lamin A/C aufweisen.

Die Missense-Mutation R644C in Exon 11 betrifft die C-terminale *tail*-Domäne des Lamin A, aber nicht das Lamin C. Dementsprechend sieht die phänotypische Ausprägung der Mutation anders aus als die der Mutationen, die die *rod*-Domäne des Lamin A und C betreffen. Es fällt auf, dass der Patient mit der Mutation R644C, verglichen mit den anderen zwei Patienten mit den Mutationen in der *rod*-Domäne und anderen Patienten des Kollektivs, eine mildere DCM ohne Herzrhythmus- und Reizleitungsstörung entwickelte. Dieses klinische Bild wurde ebenfalls von anderen Autoren beschrieben, dass Patienten, die nur in Lamin A-Isoform Mutationen aufweisen, möglicherweise eine mildere Form der DCM ohne Herzrhythmus- und Reizleitungsstörung entwickeln [11, 42]. Bei der Schwester des Patienten, die 7 Jahre nach der Diagnosestellung eine Herzrhythmusstörung entwickelte, könnte man davon ausgehen, dass sie später durch degenerative Veränderung im Rahmen der DCM die Rhythmusstörung entwickelte. Diese Beobachtung könnte zu der Überlegung führen, dass eine Mutation im Lamin-Gen möglicherweise dann eine Reizleitungsstörung verursacht, wenn beide Lamin A und C von der Mutation betroffen sind. Damit könnte man davon ausgehen, dass in der Pathogenese der Reizleitungsstörung in Kombination mit DCM wahrscheinlich Lamin C eine wichtigere Rolle spielt als Lamin A. Dies könnte dadurch erklärt werden, dass Lamin A nur an seine *rod*-Domäne Chromatin binden kann, während Lamin C Chromatin auch an seine *tail*-Domäne bindet [59].

Interessanterweise sind Mutationen im Exon 11 und damit in der Lamin A-Isoform in Patienten mit einem breiten Spektrum von Laminopathien beschrieben worden. *Mercuri et al.* [60] beschreiben vier Patienten mit zwei verschiedenen Mutationen im Exon 11. Die Patientin mit der Mutation c.1931G>A, die in gleichem Codon liegt wie in unserer Untersuchung, aber die Aminosäure Arginin zu Histidin verändert (R644H), entwickelte schon nach der Geburt verschiedene Skelettmypathien und ist im Alter von 30 Monaten verstorben. Die anderen 3 Patienten hatten die Mutation c.1930C>T, die der gleichen Mutation entspricht wie in unserem Patientenfall (R644C). Die Patienten erkrankten an Emery-Dreifuß-, Glieder-Gürtel-

Muskeldystrophie und DCM mit aggressivem Verlauf bis zur Indikation zur Herztransplantation bei einem Patienten. *Speckman et al. (erreta, 2000b)* identifizierten im Rahmen einer genetischen Analyse von Patienten mit FPL (familiäre partielle Lipodystrophie) in einem Verwandten eines Betroffenen die Mutation R644C. Andere Mutationen im Exon 11, die andere Aminosäurekodons betreffen, wurden ebenfalls im Zusammenhang mit Lipodystrophie (R582H) [61], aber auch im Zusammenhang mit HGPS (Hutchinson-Gilford-Progerie-Syndrom) [62] identifiziert. Im Gegensatz dazu weist der Mutationsträger in unserer Untersuchung kein Anzeichen von FPL, HGPS oder Skelettmuskelbeteiligung. Diese Daten zusammen mit unseren Daten zeigen, dass Mutationen im Exon 11, die nur Lamin A betreffen, ein breites Spektrum von Phänotypen verursachen können.

5.6 Bedeutung der Mutationen auf molekularer Ebene

Die Mutationen wurden in unterschiedlichen Exons identifiziert und damit sind auch unterschiedliche Domänen des Lamin A/C betroffen (Abb.26). Die Mutationen E203V und K219T kommen in den Exons 3 und 4 vor und betreffen das Coil1b der α -helikalen *rod*-Domäne des Lamin A und C. Dieses Ergebnis zusammen mit anderen Untersuchungen [11, 38, 63] zeigten, dass, obwohl DCM verursachende Mutationen überall im LMNA Gen vorkommen, Mutationen im Zusammenhang mit DCM im Coil1b häufig zu sein scheinen. Im Vergleich dazu untersuchten *Benedetti et al.*[64] ein Kollektiv, bestehend aus Patienten mit neuromuskulären Erkrankungen (Emery-Dreifuß-Muskeldystrophie und Glieder-Gürtel-Muskeldystrophie), und beschrieben eine breite Streuung der Mutationen im gesamten Lamin Protein, aber nicht in der Coil1b-Domäne.

Das Coil1b spielt u.a. bei der Interaktion zwischen Lamin B und Lamin A/C eine Rolle (Abb.26). Ist die Struktur des Coil1b durch die identifizierten Mutationen beeinträchtigt, kann die genannte Interaktion und andere bisher unbekannte Funktionen des Coil1b der α -helikalen *rod*-Domäne des Lamin A und C nicht mehr erfüllt werden. Die Strukturveränderung kommt dadurch zustande, dass die Mutation E203V den Aminosäureaustausch Glutaminsäure (sauer) zu Valin (neutral) und die Mutation K219T den Aminosäureaustausch Lysin (basisch) zu Threonin (polar) verursachen. Durch die Veränderung der Ladungen der Aminosäuren in Coil1b ist das Heptad-Wiederholungsmuster nicht mehr gewährleistet (siehe Kapitel 1.3.1 S.5). Dieses Wiederholungsmuster besteht aus hydrophoben und polaren Aminosäuren, wobei die hydrophoben Aminosäuren in der Position a und d, die geladenen Aminosäuren in der Position e und g und die polaren Aminosäuren anderswo lokalisiert sind (Abb.2, S.8). Eine Beeinträchtigung dieses Musters hat die Zerrüttung, die Fragilität und eine Zerbrechlichkeit des

Coiled-Coil des Lamin A und C zur Folge. Dieses Ungleichgewicht kann die Dimerisation und Anordnung des Lamin A/C in Mitleidenschaft ziehen. Die entsprechenden morphologischen Veränderungen wurden anhand Immunelektronenmikroskopie und konventioneller Mikroskopie von *Venga et al.* [65] gezeigt. Die Veränderungen beinhalteten Bläschenbildung aus Zellkernmembran, Herniation und Delamination von der nukleären Lamina und Zusammenlagerung der Kernporen. Auf der anderen Seite zeigen *Sylvius et al.* [66], dass während der Zellkern von Kardiomyozyten der Mutationsträger D192G im Lamin mit DCM beträchtliche Veränderungen aufweisen, zeigen die Kardiomyozyten von DCM Patienten mit der Mutation R541S nur unspezifische bzw. keine Veränderungen. Deshalb scheint eine direkte Korrelation zwischen der Mutation und der morphologischen Veränderung schwierig zu sein.

Eine gestörte Lamin-Organisation durch den oben erklärten Mechanismus führt dann zu einer abnormalen Interaktion zwischen Lamin und nukleärer Membran und intranukleären Komponenten wie Chromosomen, Transkriptionsfaktoren und anderen Lamin-bindenden Proteinen. Beispielsweise eine gestörte Interaktion zwischen dem Lamin und dem BAF (*Barrier to Autointegration Factor*), das ein essentielles Protein ist und dsDNA (Doppelstrang DNA) bindet, und dem RB (*Retinoblastoma*), der ein Transkriptionsfaktor ist, hat eine Beeinträchtigung der Organisation des Zellzyklus, der Replikation und der Transkription und damit der Zellfunktion während der Interphase zur Folge [33]. *Sylvius et al.* [66] konnten anhand von *in vivo* und *in vitro* Studien zeigen, dass eine Mutation D192G im Lamin A in Patienten mit Endstadium DCM zur Dysregulation bzw. Störung der posttranslationalen Modifikation (Sumoylation) mittels SUMO1 führt. SUMO (small ubiquitin-like modifier 1-4) ist ein Regulator von Proteinfunktionen, der in der posttranslationalen Modifikation, in der Chromatinorganisation und Genexpression involviert ist. Bei der Sumoylation bildet das SUMO-Protein eine kovalente Bindung mit der Aminosäure Lysin in der Konsensussequenz $\Psi K X E$ (Ψ steht für eine hydrophobe Aminosäure). Interessanterweise hat das Lamin A so eine Konsensussequenz $\Psi K X E$, wobei die Aminosäure Lysin in der Position 201 steht [67]. *Zhang et al.* [67] zeigen anhand experimentieller Untersuchungen, dass sowohl eine Veränderung der Aminosäure Lysin in der Position 201 als auch die Mutationen E203G und E203K zu einer verringerten Sumoylation im Lamin A führen.

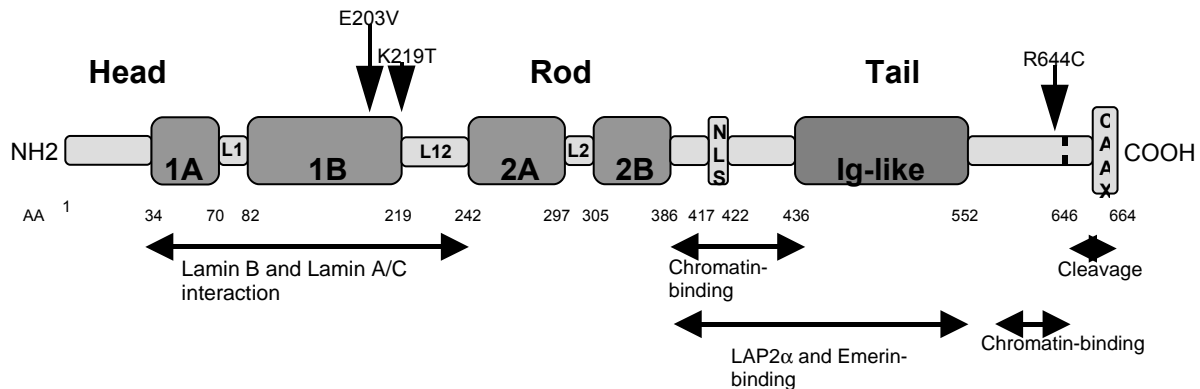


Abbildung 26: Die Abbildung zeigt die von den Mutationen betroffenen Regionen des Lamin A/C und deren intranukleären Interaktionsmöglichkeiten. Modifiziert nach Perrot et al. 2008

Die Mutation R644C betrifft die *tail*-Domäne des Lamin A, aber nicht die des Lamin C. Die genaue Funktion der *tail*-Domäne bei der Anordnung von Lamin ist unklar. Auch die Rolle bei der *head-to-tail* Organisation ist noch unklar. Eine *in vitro* Studie mittels *tail*- und *head*-losem Lamin B2 zeigt, dass während *tail*-loses Lamin durch die Bildung von *head-to-tail* Ordnung genau solche langen Filamente bilden, die von normalem Lamin gebildet werden, ist die Bildung einer *head-to-tail* Ordnung des *head*-losen Lamin unmöglich [32]. Dennoch scheint die *tail*-Domäne in der Kontrolle der seitlichen Anordnung der Protofilamente zur Bildung der 10 nm Filamente und der Entstehung des Lamin-Netzwerkes eine Rolle zu spielen [19].

Diese Untersuchung mit den Ergebnissen von anderen Untersuchungen [39, 60] zeigten, dass die Mutation R644C einen pleiotropen Effekt auf die Betroffenen ausübt. Die Ursache liegt wahrscheinlich darin, dass die Mutation zu einem Aminosäureaustausch nahe der CAAX-Region führt, wodurch wahrscheinlich das posttranslationale Processing des Prelamin A beeinträchtigt wird. Denn die Protease ZMPSTE24, die beim Abspalten der AAX-Aminosäuren des Prelamin A zum Einsatz kommt, kann die richtige Spaltstelle nur durch die korrekte Aminosäuresequenz erkennen [38].

Ferner könnten die vielfältigen Interaktionsmöglichkeiten der *tail*-Domäne den pleiotropen Effekt der von uns und von anderen Arbeitsgruppen identifizierten Mutation R644C erklären

(Abb.25). Eine Mutation, die die *tail*-Domäne des Lamin A beeinträchtigt, beeinflusst u.a. die Beziehung zwischen dieser Region und Chromosomen, Chromatine, LAP2 α und Emerin. *Sullivan et al.* [68] transfizierten cDNA des humanen Lamin A in LMNA-Null-Tiere und beobachteten, dass während Emerin in Lamin A-Null-Zellen zwischen Kernhülle und Zytoplasma verteilt ist, bleibt die Verteilung von Emerin in Zellen, die Lamin A exprimieren, nur auf den Zellkern beschränkt. Diese Untersuchung gibt eine Erklärung dafür, wie durch eine Mutation die Beziehung zwischen *tail*-Domäne des Lamin A und anderen Kernkomponenten wie Emerin beeinträchtigt wird.

Die oben genannte Untersuchung von *Sullivan et al.* beantwortet aber nicht die Frage, warum Patienten mit den gleichen Mutationen nicht erkranken. Deshalb kann man mit einer hohen Wahrscheinlichkeit davon ausgehen, dass bei den durch Mutationen in Lamin-Gen verursachten verschiedenen Phänotypen andere Faktoren bzw. andere Proteine im Spiel sind. Aber auch die sogenannten *Modifier*-Gene scheinen im Sinne der Phänotyperscheinung bei dem einen einen positiven Effekt und bei dem anderen einen negativen Effekt auszuüben.

Die *Modifier*-Gene können vielleicht Einfluss auf die Kompensationsmechanismen haben, die den Einfluss einer Mutation dämpfen. Zum Beispiel eine Mutation, die nur Lamin A betrifft, kann- wie in Tiermodellen gezeigt wurde [69]- dazu führen, dass Lamin C kompensatorisch hochreguliert wird, um die Funktion des Lamin A zu kompensieren. Aber dieser kompensatorische Mechanismus findet wahrscheinlich nicht in jedem Individuum in gleichem Maße statt. Deshalb führt die Mutation in verschiedenen Betroffenen, aber auch in Betroffenen innerhalb einer Familie zu unterschiedlichen phänotypischen Ausprägungen.

5.7 Effekte der Lamin A/C-Mutationen in der Pathogenese der DCM

Im Zusammenhang mit hypertropher Kardiomyopathie (HCM) kodieren die meisten identifizierten Krankheitsgene Sarkomerproteine. Dementsprechend wurde die HCM als eine Erkrankung des Sarkomers und der defekten Krafterzeugung bezeichnet. Ähnlich wie bei HCM versuchten die Forscher so ein Modell auch für DCM zu entwickeln. Da die einzelnen DCM-verursachenden Mutationen in den Genen identifiziert wurden, die extrasarkomerische Zytoskelettproteine kodieren, wurde DCM zuerst als Erkrankung der defekten Kraftübertragung bezeichnet. Allerdings ist heute bekannt, dass DCM durch Mutationen sowohl in sarkomerischen und intrasarkomerischen Proteinen als auch in den nukleären Proteinen (Lamin A/C) verursacht werden kann.

Es wird angenommen, dass die Mutationen in Lamin A/C zu einer mechanischen Instabilität des Zellkerns, einer Verklumpung des Chromatins und einer Veränderung der Transkription und der Genexpression führen. Die nukleären Lamine steuern zur Strukturintegrität der Kernhülle bei und liefern dem Zellkern eine mechanische Unterstützung. Sie haben eine wichtige Rolle in der Organisation von Chromatin in der Interphase und im Wiedereinbau von Kernmembran während der Mitose in teilungsfähigen Zellen [70, 71]. In teilungsunfähigen Zellen ermöglichen die Lamine durch Signaltransduktion eine reibungslose Bewegung von Molekülen zwischen dem Zytoplasma und dem Zellkern [72]. Daher kann ein möglicher Effekt von Mutationen in Lamin eine Funktionsbeeinträchtigung des Zellkerns sein, was zur Apoptose der Myozyten führt. Nach Untergang der Myozyten setzt dann die Infiltration von Fettzellen in das Myokard, in das Reizleitungssystem oder in das Skelettmuskelsystem (bei Patienten mit EDMD) ein [42, 73].

Wie genau eine Mutation im Lamin-Gen zur Apoptose in den Myozyten führt, ist wenig bekannt. Eine Missense-Mutation in der *rod*-Domäne führt zur Strukturveränderung in dieser Region und zur Beeinträchtigung der Interaktion mit zytoplasmatischen Proteinen. Besonders wichtige Proteine in diesem Zusammenhang sind Intermediärfilamente des Sarkomers, das durch Aktin gestützte Zytoskelett und das Sarkolemma. Von den genannten Proteinen sind einige in die Pathogenese der DCM involviert [14, 74, 75].

Bisher gibt es wenige bzw. keine Daten, die eine direkte Beteiligung des Lamin A/C an der Kraftübertragung und -erzeugung in den Herzmuskelzellen beweisen. Es sind verschiedene Hypothesen entwickelt worden, die eine systolische Dysfunktion und damit eine DCM durch Mutationen im Lamin A/C-Gen erklären könnten. Im Mittelpunkt der "strukturellen" Hypothese stehen die strukturelle Abnormalität in den nukleären Laminen durch Mutationen und die daraus resultierende Fragilität und Beeinträchtigung der Kernhülle in mechanisch beanspruchten kontraktile Geweben wie Skelett- und Herzmuskeln. Nikolova et al. [37] konnten anhand von Lamin(-/-)-Zellen in Mäusen zeigen, dass durch eine beeinträchtigte Interaktion zwischen Lamin A/C und dem muskelspezifischen Desmin-Netzwerk und daraus folgende verringerte Zytoskelettspannung in den kardialen Muskelzellen die Kraftübertragung gestört wird. Dies führte zu einer systolischen Dysfunktion, was für DCM charakteristisch ist. Lammerding et al. [76, 77] konnten anhand von Tierversuchen zeigen, dass Lamin A/C-defiziente Fibroblasten eine veränderte mechanische Belastbarkeit und eine veränderte Mechanotransduktion aufweisen. Diese Veränderungen äußern sich in einer zunehmenden Kernfragilität und -deformation, einer veränderten Expression der mechanosensitiven Gene und einer gestörten Aktivierung der Transkription. All diese Veränderungen führen gemeinsam zur Beeinträchtigung der Lebensfähigkeit einer mechanisch gestressten Zelle. Diese Beobachtungen von Lammerding

könnten ebenfalls die Tatsache erklären, dass einige durch LMNA-Mutationen verursachte Phänotypen wie DCM, Skelettmypopathien und partielle Lipodystrophie nicht bei der Geburt vorhanden sind, sondern sich erst im Laufe des Lebens entwickeln. Die Diagnose von DCM bei den Mutationsträgern in dieser Untersuchung wurde bei einem Durchschnittsalter von 54 J ($\pm 8,5$ J) gestellt. Bei keinem der Mutationsträger war die DCM von Geburt an vorhanden. Diese Überlegung würde mit der Hypothese übereinstimmen, dass LMNA-Mutationen dem Mutationsträger eine erhöhte Prädisposition zu bestimmten degenerativen Prozessen wie Apoptose oder biomechanischer Stress (wiederholende Kontraktionen, hoher Energieverbrauch) verleiht [13]. Das heißt, es ist erst nach wiederholter Belastung im Laufe des Lebens zur Funktionsbeeinträchtigung und/oder –verlust der betroffenen Region des Lamin gekommen.

Die Hypothese der “Genregulation” besagt, dass Mutationen im LMNA-Gen eine gewebespezifische Dysregulation der Genexpression verursachen. Sie verursachen gestörte Interaktionen zwischen Lamin-Proteinen und Heterochromatin, Transkriptionsregulatoren oder posttranskriptionalen Faktoren wie SUMO. *Zhang et al.* [67] untersuchten weitere Folgen einer beeinträchtigten Sumoylation und zeigen, dass eine verringerte Sumoylation eine Fehllokalisation des Lamin A im Zellkern der untersuchten Kardiomyozyten zur Folge hat. Anhand von Mausmodellen untersuchten sie weitere Konsequenzen einer gestörten Sumoylation und zeigten, dass die Kardiomyozyten von Mäusen mit den Mutationen K201R, E203G und E203K eine höhere Rate an Zelltod aufweisen als die Kontrollgruppe.

Der Effekt einer Mutation im LMNA-Gen auf die Genregulation hängt von ihrer Position im Gen und in der betroffenen Region (oder Bindungsseite) des Proteins ab. Beispielsweise, führt eine Mutation zur Beeinträchtigung der Interaktion mit Chromatin, kann dadurch ein globaler Effekt auf Genexpression ausgeübt werden. Aber eine andere Mutation, die eine Beziehung zu einem Transkriptionsregulator beeinträchtigt, hat einen spezifischen Effekt auf Genexpression [38]. Unterschiedliche Effekte können auch dadurch zustande kommen, dass Lamin A- und Lamin C-Domänen unterschiedliche Bindungsseiten haben. Anders als bei Lamin A, das nur mit der Chromatin-bindenden Seite seiner α -helikalen *Rod* eine Verbindung mit Core-Histonen herstellen kann [78], kann Lamin C Chromatin auch an seine *tail*-Domäne binden [59]. Dementsprechend verursachen verschiedene Mutationen im Lamin-Protein ebenfalls unterschiedliche Phänotypen und Schweregrade des Erscheinungsbildes. Diese Erkenntnis kann man auch an den Mutationsträgern in unserer Untersuchung gewinnen. Die Mutationsträger in der *rod*-Domäne haben ein aggressiveres Krankheitsbild als der Mutationsträger in der *tail*-Domäne.

Das Ausmaß des Effektes einer Mutation in Lamin hängt davon ab, ob eine einzige Aminosäure verändert ist oder das gesamte Lamin A/C-Protein, wie es bei einer Nonsense-Mutation der Fall sein kann. Ersterer hätte dann wahrscheinlich die Störung einer einzigen Interaktion mit einem der nachgeschalteten Proteine oder Transkriptionsfaktoren zur Folge. Letzterer würde die gesamte Lamin A/C-Funktion oder zumindest mehrere Interaktionen zwischen Lamin A/C und den nachgeschalteten Proteinen in Mitleidenschaft ziehen.

Den oben genannten pathophysiologischen Mechanismen, die in der Entstehung der DCM durch eine Mutation im LMNA verwickelt sein könnten, liegt entweder eine Strukturveränderung des Lamin A/C oder der Einbau einer falschen Aminosäure in ein Sequenzmotiv zugrunde. Letzteres führt dazu, dass das Sequenzmotiv nicht mehr erkannt wird, wodurch ein Funktionsausfall entsteht. Aber wie im Einzelnen eine Mutation in Lamin zu DCM und AVB führt, ist noch nicht genau geklärt.

5.8 Weiterführende Untersuchungen

Mutationen im LMNA Gen sind insofern einzigartig, da es kaum ein anderes Gen gibt, dessen Mutationen so viele verschiedene Effekte auf die Betroffenen haben. Diese Tatsache zeigt, dass Lamin-Proteine in vielen verschiedenen Kaskaden und Funktionen involviert sind. Mutationssuche im LMNA Gen in Patienten mit DCM und anderen Laminopathien erweitert das Spektrum des Wissens über die Genotyp-Phänotyp-Korrelation und darüber hinaus die relevanten involvierten Pathomechanismen.

Um zu verstehen, warum Mutationen in LMNA verschiedene Erkrankungen hervorrufen und welche relevanten intrazellulären Kaskaden in der Entstehung einer durch die Mutation verursachten Erkrankung involviert sind, wurden Tiermodelle (insbesondere Mausmodelle) entwickelt. Es wurden bisher verschiedene Mauslinien in der Forschung von Mutationen im Lamin-Gen etabliert. Während in einer Mauslinie das Lamin A oder C ausgeschaltet wurde (*Lmna*^{-/-}), wurden in den anderen Mauslinien Missense-Mutationen wie H222P und N195K eingebracht. In anderen Mauslinien werden Mäuse gezüchtet, in deren Herzmuskelzellen mutierte Lamin A exprimiert wird [79]. Interessanterweise eignet sich die Mauslinie, in die die Mutation N195K transfiziert wurde, gut für die Untersuchung von Mutationen, die DCM mit Reizleitungsstörung verursachen. Die Mutation N195K betrifft das Coil1b der α -helikalen rod-Domäne des Lamin A und C. Die Mauslinie, die für die genannte Mutation homozygot war, zeigte die gleichen Krankheitsbilder wie die bei unseren Mutationsträgern beschrieben wurden, nämlich DCM mit Reizleitungsstörung ohne Anzeichen für Skelettmuskeldystrophie. Des Weiteren konnte in dieser Mauslinie gezeigt werden, dass die Mutation zur Fehlexpression

und/oder Fehllokalisation von Transkriptionsfaktoren Hf1b/Sp4 und der Gap-Junction Proteine Connexine-40 und -43 führte. Auch eine Störung der Organisation von Desmin konnte in derselben Mauslinie nachgewiesen werden [80]. Anhand dieses Beispiels wird es deutlich, dass mittels Tiermodellen die durch eine Mutation beeinträchtigte Organisation und Expression von intrazellulären Komponenten wie z.B. Transkriptionsfaktoren erforscht werden könnten [80].

6. Zusammenfassung

Die familiäre dilatative Kardiomyopathie (fDCM) ist eine primäre Erkrankung der Herzmuskulatur, die durch eine ventrikuläre Dilatation und eine eingeschränkte systolische Funktion charakterisiert ist. 25-30% der DCM-Fälle sind familiär bedingt. Das LMNA-Gen kodiert die Proteine Lamin A und C, die eine wichtige Rolle am Aufbau der inneren Membran des Zellkerns spielen. Mutationen in diesem Gen sind eine relativ häufige Ursache für familiäre DCM.

Methoden

Mittels körperlicher Untersuchung, EKG, Echokardiographie und Herzkatheteruntersuchung wurden 73 nichtverwandte Indexpatienten mit gesicherter familiärer DCM erfasst. Ein Screening auf Mutationen wurde mittels PCR, direkter Sequenzierung, Single-Strand-Conformational-Polymorphism-Analyse und Restriktionsverdau in den 12 kodierenden Exons des LMNA-Gens durchgeführt. Die Kontrollgruppe (n=300) bestand aus Patienten, bei denen eine DCM klinisch ausgeschlossen worden war.

Ergebnisse

Drei verschiedene heterozygote Basenaustausch-Mutationen wurden in drei nichtverwandten Patienten (4% des Kollektivs) gefunden. Eine neue Mutation c.820A>T wurde im Exon 3 in einem bekannten Hotspot identifiziert, die zu einem Austausch von Glutaminsäure Glutamin zu Valin führt (E203V). Eine weitere neue Mutation c.868A>C wurde im Exon 4 identifiziert, die zu einem Austausch von Lysin zu Threonin führt (K219T). Im Exon 11 wurde eine bekannte Mutation c.2143C>T identifiziert, die zu einem Austausch von Arginin zu Cystein führt (R644C). Die Mutationen E203V und K219T liegen in einem hochkonservierten Bereich im Coil 1b der α -helikalen Domäne von Lamin A und Lamin C. Die Mutation R644C hingegen liegt in einem hochkonservierten Bereich des globulären C-terminalen Endes und betrifft nur Lamin A. Wir konnten in 600 Kontroll-Allelen keine der drei Mutationen nachweisen. Es wurde eine genetische Untersuchung bei insgesamt 5 weiteren Familienangehörigen der Indexpatienten durchgeführt. Wir konnten außerdem 5 verschiedene bekannte synonyme SNPs in 5 verschiedenen Exons in einer großen Anzahl von Patienten identifizieren.

Schlussfolgerung

Obwohl bisher schon mehr als 30 Mutationen im LMNA-Gen im Zusammenhang mit familiärer DCM beschrieben worden sind, konnten wir neue Mutationen in diesem Gen identifizieren. Dies bestätigt die sehr hohe genetische Variabilität der familiären DCM. Mutationen im Coil1b der *rod*-Domäne sind verbunden mit einer progressiven Form von DCM und Herzreizleitungsstörung.

Isolierte Mutationen im Lamin A scheinen eher mit einer milden DCM ohne Reizleitungsstörungen verbunden zu sein. Offenbar spielt Lamin C in der Pathogenese der Reizleitungsstörungen eine wichtige Rolle.

Aufgrund unserer Untersuchungen können wir eine genetische Analyse des LMNA Gens in den betroffenen Familien empfehlen, um rechtzeitig eine adäquate Therapie bei den Betroffenen und Angehörigen zu beginnen.

Literaturverzeichnis

1. Nieminen, M.S. and V.P. Harjola, *Definition and epidemiology of acute heart failure syndromes*. Am J Cardiol, 2005. **96**: p. 5G-10G.
2. Weir, R.A. and J.J. McMurray, *Epidemiology of heart failure and left ventricular dysfunction after acute myocardial infarction*. Curr Heart Fail Rep, 2006. **3**: p. 175-80.
3. Meredith, P.A. and J. Ostergren, *From hypertension to heart failure -- are there better primary prevention strategies?* J Renin Angiotensin Aldosterone Syst, 2006. **7**: p. 64-73.
4. Osterziel, K.J., et al., *[Familial dilated cardiomyopathy]*. Herz, 2005. **30**: p. 529-34.
5. Maron, B.J., et al., *Contemporary definitions and classification of the cardiomyopathies: an American Heart Association Scientific Statement from the Council on Clinical Cardiology, Heart Failure and Transplantation Committee; Quality of Care and Outcomes Research and Functional Genomics and Translational Biology Interdisciplinary Working Groups; and Council on Epidemiology and Prevention*. Circulation, 2006. **113**: p. 1807-16.
6. Seidman, J.G. and C. Seidman, *The genetic basis for cardiomyopathy: from mutation identification to mechanistic paradigms*. Cell, 2001. **104**: p. 557-67.
7. Felker, G.M., et al., *Underlying causes and long-term survival in patients with initially unexplained cardiomyopathy*. N Engl J Med, 2000. **342**: p. 1077-84.
8. Fatkin, D., *Guidelines for the diagnosis and management of familial dilated cardiomyopathy*. Heart Lung Circ, 2007. **16**: p. 19-21.
9. Richardson, P., et al., *Report of the 1995 World Health Organization/International Society and Federation of Cardiology Task Force on the Definition and Classification of cardiomyopathies*. Circulation, 1996. **93**: p. 841-2.
10. Mestroni, L., et al., *Guidelines for the study of familial dilated cardiomyopathies*. Collaborative Research Group of the European Human and Capital Mobility Project on Familial Dilated Cardiomyopathy. Eur Heart J, 1999. **20**: p. 93-102.
11. Taylor, M.R., et al., *Natural history of dilated cardiomyopathy due to lamin A/C gene mutations*. J Am Coll Cardiol, 2003. **41**: p. 771-80.
12. Grunig, E., et al., *Frequency and phenotypes of familial dilated cardiomyopathy*. J Am Coll Cardiol, 1998. **31**: p. 186-94.
13. Fatkin, D. and R.M. Graham, *Molecular mechanisms of inherited cardiomyopathies*. Physiol Rev, 2002. **82**: p. 945-80.

14. Olson, T.M., et al., *Actin mutations in dilated cardiomyopathy, a heritable form of heart failure*. Science, 1998. **280**: p. 750-2.
15. Burkett, E.L. and R.E. Hershberger, *Clinical and genetic issues in familial dilated cardiomyopathy*. J Am Coll Cardiol, 2005. **45**: p. 969-81.
16. Mestroni, L., et al., *Familial dilated cardiomyopathy: evidence for genetic and phenotypic heterogeneity*. Heart Muscle Disease Study Group. J Am Coll Cardiol, 1999. **34**: p. 181-90.
17. Murphy, R.T., et al., *Novel mutation in cardiac troponin I in recessive idiopathic dilated cardiomyopathy*. Lancet, 2004. **363**: p. 371-2.
18. Suomalainen, A., et al., *Inherited idiopathic dilated cardiomyopathy with multiple deletions of mitochondrial DNA*. Lancet, 1992. **340**: p. 1319-20.
19. Stuurman, N., et al., *Nuclear lamins: their structure, assembly, and interactions*. J Struct Biol, 1998. **122**: p. 42-66.
20. Aebi, U., et al., *The nuclear lamina is a meshwork of intermediate-type filaments*. Nature, 1986. **323**: p. 560-4.
21. Stuurman, N., et al., *Intermediate filament protein polymerization: molecular analysis of Drosophila nuclear lamin head-to-tail binding*. J Struct Biol, 1996. **117**: p. 1-15.
22. Isobe, K., et al., *The last twenty residues in the head domain of mouse lamin A contain important structural elements for formation of head-to-tail polymers in vitro*. Biosci Biotechnol Biochem, 2007. **71**: p. 1252-9.
23. Conway, J.F. and D.A. Parry, *Structural features in the heptad substructure and longer range repeats of two-stranded alpha-fibrous proteins*. Int J Biol Macromol, 1990. **12**: p. 328-34.
24. Parry, D.A., et al., *Structural studies on lamin. Similarities and differences between lamin and intermediate-filament proteins*. Biochem J, 1986. **238**: p. 305-8.
25. Loewinger, L. and F. McKeon, *Mutations in the nuclear lamin proteins resulting in their aberrant assembly in the cytoplasm*. Embo J, 1988. **7**: p. 2301-9.
26. Heald, R. and F. McKeon, *Mutations of phosphorylation sites in lamin A that prevent nuclear lamina disassembly in mitosis*. Cell, 1990. **61**: p. 579-89.
27. Maller, J., et al., *Maturation-promoting factor and the regulation of the cell cycle*. J Cell Sci Suppl, 1989. **12**: p. 53-63.
28. Beck, L.A., et al., *Isoprenylation is required for the processing of the lamin A precursor*. J Cell Biol, 1990. **110**: p. 1489-99.

29. Sinensky, M., et al., *The processing pathway of prelamin A*. J Cell Sci, 1994. **107 (Pt 1)**: p. 61-7.
30. Letai, A. and E. Fuchs, *The importance of intramolecular ion pairing in intermediate filaments*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**: p. 92-6.
31. Stuurman, N., et al., *Interactions between coiled-coil proteins: Drosophila lamin Dm0 binds to the bicaudal-D protein*. Eur J Cell Biol, 1999. **78**: p. 278-87.
32. Heitlinger, E., et al., *The role of the head and tail domain in lamin structure and assembly: analysis of bacterially expressed chicken lamin A and truncated B2 lamins*. J Struct Biol, 1992. **108**: p. 74-89.
33. Gruenbaum, Y., et al., *The nuclear lamina comes of age*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2005. **6**: p. 21-31.
34. Moir, R.D., et al., *Dynamic properties of nuclear lamins: lamin B is associated with sites of DNA replication*. J Cell Biol, 1994. **125**: p. 1201-12.
35. Burke, B. and C.L. Stewart, *Life at the edge: the nuclear envelope and human disease*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2002. **3**: p. 575-85.
36. Gruenbaum, Y., et al., *The nuclear lamina and its functions in the nucleus*. Int Rev Cytol, 2003. **226**: p. 1-62.
37. Nikolova, V., et al., *Defects in nuclear structure and function promote dilated cardiomyopathy in lamin A/C-deficient mice*. J Clin Invest, 2004. **113**: p. 357-69.
38. Capell, B.C. and F.S. Collins, *Human laminopathies: nuclei gone genetically awry*. Nat Rev Genet, 2006. **7**: p. 940-52.
39. Genschel, J. and H.H. Schmidt, *Mutations in the LMNA gene encoding lamin A/C*. Hum Mutat, 2000. **16**: p. 451-9.
40. Mounkes, L., et al., *The laminopathies: nuclear structure meets disease*. Curr Opin Genet Dev, 2003. **13**: p. 223-30.
41. Mattout, A., et al., *Nuclear lamins, diseases and aging*. Curr Opin Cell Biol, 2006. **18**: p. 335-41.
42. Fatkin, D., et al., *Missense mutations in the rod domain of the lamin A/C gene as causes of dilated cardiomyopathy and conduction-system disease*. N Engl J Med, 1999. **341**: p. 1715-24.
43. Arbustini, E., et al., *Autosomal dominant dilated cardiomyopathy with atrioventricular block: a lamin A/C defect-related disease*. J Am Coll Cardiol, 2002. **39**: p. 981-90.

44. Hershberger, R.E., et al., *A novel lamin A/C mutation in a family with dilated cardiomyopathy, prominent conduction system disease, and need for permanent pacemaker implantation*. Am Heart J, 2002. **144**: p. 1081-6.
45. Jakobs, P.M., et al., *Novel lamin A/C mutations in two families with dilated cardiomyopathy and conduction system disease*. J Card Fail, 2001. **7**: p. 249-56.
46. Bonne, G., et al., *Mutations in the gene encoding lamin A/C cause autosomal dominant Emery-Dreifuss muscular dystrophy*. Nat Genet, 1999. **21**: p. 285-8.
47. Charniot, J.C., et al., *Severe dilated cardiomyopathy and quadriceps myopathy due to lamin A/C gene mutation: a phenotypic study*. Eur J Heart Fail, 2006. **8**: p. 249-56.
48. Perrot, A., et al., *Genetic and phenotypic analysis of dilated cardiomyopathy with conduction system disease: demand for strategies in the management of presymptomatic lamin A/C mutant carriers*. Eur J Heart Fail, 2006. **8**: p. 484-93.
49. Karkkainen, S., et al., *Novel mutations in the lamin A/C gene in heart transplant recipients with end stage dilated cardiomyopathy*. Heart, 2006. **92**: p. 524-6.
50. Brodsky, G.L., et al., *Lamin A/C gene mutation associated with dilated cardiomyopathy with variable skeletal muscle involvement*. Circulation, 2000. **101**: p. 473-6.
51. Sinagra, G., et al., *Current perspective new insights into the molecular basis of familial dilated cardiomyopathy*. Ital Heart J, 2001. **2**: p. 280-6.
52. Lahiri, D.K. and B. Schnabel, *DNA isolation by a rapid method from human blood samples: effects of MgCl₂, EDTA, storage time, and temperature on DNA yield and quality*. Biochem Genet, 1993. **31**: p. 321-8.
53. Eshleman, S.H., et al., *Sensitivity and specificity of the ViroSeq human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) genotyping system for detection of HIV-1 drug resistance mutations by use of an ABI PRISM 3100 genetic analyzer*. J Clin Microbiol, 2005. **43**: p. 813-7.
54. Sylvius, N. and F. Tesson, *Lamin A/C and cardiac diseases*. Curr Opin Cardiol, 2006. **21**: p. 159-65.
55. Hermida-Prieto, M., et al., *Familial dilated cardiomyopathy and isolated left ventricular noncompaction associated with lamin A/C gene mutations*. Am J Cardiol, 2004. **94**: p. 50-4.
56. Parks, S.B., et al., *Lamin A/C mutation analysis in a cohort of 324 unrelated patients with idiopathic or familial dilated cardiomyopathy*. Am Heart J, 2008. **156**: p. 161-9.
57. Speckman, R.A., et al., *Mutational and haplotype analyses of families with familial partial lipodystrophy (Dunnigan variety) reveal recurrent missense mutations in the globular C-terminal domain of lamin A/C*. Am J Hum Genet, 2000. **66**: p. 1192-8.

58. Mestroni, L., et al., *Advances in molecular genetics of dilated cardiomyopathy. The Heart Muscle Disease Study Group*. *Cardiol Clin*, 1998. **16**: p. 611-21, vii.
59. Taniura, H., et al., *A chromatin binding site in the tail domain of nuclear lamins that interacts with core histones*. *J Cell Biol*, 1995. **131**: p. 33-44.
60. Mercuri, E., et al., *Extreme variability of skeletal and cardiac muscle involvement in patients with mutations in exon 11 of the lamin A/C gene*. *Muscle Nerve*, 2005. **31**: p. 602-9.
61. Garg, A., et al., *Multisystem dystrophy syndrome due to novel missense mutations in the amino-terminal head and alpha-helical rod domains of the lamin A/C gene*. *Am J Med*, 2002. **112**: p. 549-55.
62. Navarro, C.L., et al., *Loss of ZMPSTE24 (FACE-1) causes autosomal recessive restrictive dermopathy and accumulation of Lamin A precursors*. *Hum Mol Genet*, 2005. **14**: p. 1503-13.
63. Rankin, J. and S. Ellard, *The laminopathies: a clinical review*. *Clin Genet*, 2006. **70**: p. 261-74.
64. Benedetti, S., et al., *Phenotypic clustering of lamin A/C mutations in neuromuscular patients*. *Neurology*, 2007. **69**: p. 1285-92.
65. Verga, L., et al., *Loss of lamin A/C expression revealed by immuno-electron microscopy in dilated cardiomyopathy with atrioventricular block caused by LMNA gene defects*. *Virchows Arch*, 2003. **443**: p. 664-71.
66. Sylvius, N., et al., *In vivo and in vitro examination of the functional significances of novel lamin gene mutations in heart failure patients*. *J Med Genet*, 2005. **42**: p. 639-47.
67. Zhang, Y.Q. and K.D. Sarge, *Sumoylation regulates lamin A function and is lost in lamin A mutants associated with familial cardiomyopathies*. *J Cell Biol*, 2008. **182**: p. 35-9.
68. Sullivan, T., et al., *Loss of A-type lamin expression compromises nuclear envelope integrity leading to muscular dystrophy*. *J Cell Biol*, 1999. **147**: p. 913-20.
69. Fong, L.G., et al., *Prelamin A and lamin A appear to be dispensable in the nuclear lamina*. *J Clin Invest*, 2006. **116**: p. 743-52.
70. Gerace, L. and G. Blobel, *The nuclear envelope lamina is reversibly depolymerized during mitosis*. *Cell*, 1980. **19**: p. 277-87.
71. Spann, T.P., et al., *Disruption of nuclear lamin organization alters the distribution of replication factors and inhibits DNA synthesis*. *J Cell Biol*, 1997. **136**: p. 1201-12.
72. Ku, N.O., et al., *Implications of intermediate filament protein phosphorylation*. *Cancer Metastasis Rev*, 1996. **15**: p. 429-44.

73. Bharati, S., et al., *Familial congenital sinus rhythm anomalies: clinical and pathological correlations*. Pacing Clin Electrophysiol, 1992. **15**: p. 1720-9.
74. Muntoni, F., et al., *Brief report: deletion of the dystrophin muscle-promoter region associated with X-linked dilated cardiomyopathy*. N Engl J Med, 1993. **329**: p. 921-5.
75. Towbin, J.A., et al., *X-linked dilated cardiomyopathy. Molecular genetic evidence of linkage to the Duchenne muscular dystrophy (dystrophin) gene at the Xp21 locus*. Circulation, 1993. **87**: p. 1854-65.
76. Lammerding, J. and R.T. Lee, *The nuclear membrane and mechanotransduction: impaired nuclear mechanics and mechanotransduction in lamin A/C deficient cells*. Novartis Found Symp, 2005. **264**: p. 264-73; discussion 273-8.
77. Lammerding, J., et al., *Lamin A/C deficiency causes defective nuclear mechanics and mechanotransduction*. J Clin Invest, 2004. **113**: p. 370-8.
78. Glass, C.A., et al., *The alpha-helical rod domain of human lamins A and C contains a chromatin binding site*. Embo J, 1993. **12**: p. 4413-24.
79. Stewart, C.L., et al., *Mouse models of the laminopathies*. Exp Cell Res, 2007. **313**: p. 2144-56.
80. Mounkes, L.C., et al., *Expression of an LMNA-N195K variant of A-type lamins results in cardiac conduction defects and death in mice*. Hum Mol Genet, 2005. **14**: p. 2167-80.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. med. Özcelik und Herrn Prof. Dr. med. Haverkamp für die sehr gute Betreuung und die Möglichkeit, diese Thematik in ihrem Labor bearbeiten zu können.

Des Weiteren bin ich Herrn Perrot zu tiefem Dank verpflichtet, der mir bei der täglichen Arbeit inhaltlich wie praktisch als Betreuer zur Seite stand. Den anderen Mitgliedern der Arbeitsgruppe danke ich für die vielen hilfreichen Anregungen, insbesondere Fr. Köstner und Fr. Weihe für die technische Unterstützung, sowie Dr. med. Posch und Dr. med. Geier, die mir an vielen Stellen mit praktischen Ratschlägen geholfen haben.

Außerdem möchte ich mich bei meinem persönlichen Umfeld bedanken, dass mit viel Verständnis und Nachsicht auf meinen Wunsch nach einer Dissertation neben dem Medizinstudium reagiert hat.

Erklärung

Hiermit erkläre ich, Shwan Hussein, an Eides Statt, dass die vorgelegte Dissertationsschrift von mir selbst und ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst wurde, auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten darstellt und die benutzten Hilfsmittel sowie die Literatur vollständig angegeben sind.

Unterschrift

Berlin, den

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht mit veröffentlicht.

Publikation

Die vorgelegte Arbeit wurde in der Fachzeitschrift "Basic Research in Cardiology" im Januar 2009 veröffentlicht.

A. Perrot, S. Hussein, V. Ruppert, H.H.J. Schmidt, M.S. Wehnert, N.T. Duong, M.G. Posch, A. Panek, R. Dietz, I. Kindermann, M. Böhm, A. Michalewska-Wludarczyk, A. Richter, B. Maisch, S. Pankuweit, C. Özcelik „Identification of mutational hot spots in LMNA encoding lamin A/C in patients with familial dilated cardiomyopathy”, 2009 Jan;104(1):90-9.