

1 Einleitung

Vielfältige weltweite Entdeckungen und Entwicklungen in der Biologie, der Medizin und der Physik eröffnen neue Ansätze bei der Aufklärung von Krankheiten. Durch die biomedizinische Erforschung des humanen Erbmaterials werden neue Diagnostik- und Therapieansätze ermöglicht. Die Diagnose von Krankheiten mit genetischer Veranlagung wird durch neue Verfahren stark beeinflusst. Durch das Human Genom Projekt (HUGO) aber auch durch privatfinanzierte Projekte ist eine erste Arbeitsversion der Sequenz des humanen Genoms seit Mitte 2001 zugänglich (Lander *et al.* 2001; Venter *et al.* 2001). Die vollständige und weitgehend fehlerfreie Sequenz wird jedoch (voraussichtlich) erst in einigen Jahren vorliegen. Die Kenntnis der Sequenz des humanen Erbmaterials eröffnet neue Möglichkeiten in der Erforschung von Krankheiten.

1.1 Genetische Variationen

Es sind unterschiedliche "Typen" von genetischen Varianten im Genom bekannt wie Mikrosatelliten oder auch Insertions- oder Deletionspolymorphismen. Mikrosatelliten, Sequenzwiederholungen von zwei bis vier Basen, werden als DNA-Marker eingesetzt, um durch Kopplungsstudien krankheitsassoziierte Gene auf Chromosomen zu kartieren (Murray *et al.* 1994). Die Analyse genomischer DNA durch das Human Genom Projekt führte unter anderem zu der Erkenntnis, dass sich verschiedene Individuen im wesentlichen durch einen Austausch einzelner Basen (Einzelbasenpolymorphismen) unterscheiden. Bei den häufigsten im Genom vorkommenden Polymorphismen, den sogenannten „Single Nucleotide Polymorphisms“ (SNPs), handelt es sich um einzelne Basenunterschiede im Genom, die durchschnittlich alle 1000 Basen auftreten und als biallelische Polymorphismen im Genom vorliegen (Lai 2001). Unabhängig von Polymorphismen oder Mutationen werden Basensubstitutionen in Transition und Transversion unterteilt. Werden jeweils Purine (Adenin (A), Guanin (G)) oder Pyrimidine (Cytosin (C), Thymin (T)) ausgetauscht, so spricht man von Transition (A zu G, G zu A, C zu T, T zu C). Findet ein Austausch zwischen Purin-Basen und Pyrimidin-Basen statt, so spricht man von Transversion (G zu T, C zu A, G zu C, C zu G, A zu C, T zu G, A zu T und T zu A). SNPs, die innerhalb von kodierenden Genabschnitten

liegen, werden als cSNPs bezeichnet. Durch überwiegend öffentliche aber auch kommerzielle Einrichtungen sind bereits mehr als 5,7 Millionen SNPs identifiziert worden (NCBI, dbSNP Build 117). Das Auffinden von SNPs erfolgt durch die Sequenzierung mehrerer Dutzend verschiedener DNA-Proben aus unterschiedlichen Populationen. Durch den Vergleich der Sequenzen lässt sich ein SNP identifizieren, der anschließend in Studien mit speziellen Nachweisverfahren in großen Populationen nachgewiesen bzw. untersucht werden kann (Cargill *et al.* 1999). Eine alternative Strategie zum Auffinden neuer und auch zum Bestätigen bereits bekannter SNPs ist der Einsatz von *in silico* Methoden (Irizarry *et al.* 2000). Hierbei werden „Expressed Sequence Tags“ (ESTs) und genomische Klonsequenzen, die in öffentlichen Datenbanken erhältlich sind, durch spezielle Computerprogramme verglichen, um SNPs zu identifizieren (Sunyaev *et al.* 1999). Bei den durch öffentliche Einrichtungen und durch *in silico* Verfahren identifizierten SNPs gibt es eine Fehlerquote von ca. 10 % bis 50 % (Laborerfahrung). Dabei handelt es sich um falsche SNPs, die durch Sequenzierfehler verursacht werden, und in der Natur nicht vorkommen oder nur in bestimmten Populationen vorhanden sind. Unkorrekte Angaben hinsichtlich der Allelfrequenzen treten ebenfalls gehäuft auf. Die Sequenzierung als Verfahren zum Auffinden von SNPs ist kostenintensiv und zeitaufwändig, so dass es als Routineanwendung, insbesondere in akademischen Einrichtungen, zweifelsohne nicht praktikabel ist.

1.2 Die Rolle von Mutationen und Polymorphismen in der Epidemiologie

Der Unterschied zwischen Mutationen und Polymorphismen ist unter verschiedenen Gesichtspunkten abgrenzbar. So liegt ein Polymorphismus vor, wenn eine Basensubstitution mit einer Mindesthäufigkeit von einem Prozent weltweit oder in einer bestimmten klar definierten Population vorkommt (Roden *et al.* 2001). Mutationen stellen Veränderungen in Genen dar, die zu einem anderen Proteinprodukt als dem des Wildtyps führen können. Sie stehen in direkter Beziehung zu einem Phänotyp bei einem einfachen monogenen Erbgang. Sie kommen auf Chromosomenebene als Duplikationen, Inversionen, Deletionen, Translokationen oder auf Genebene meistens als Punktmutationen vor. Betroffen sind nur wenige Personen oder Familien, womit auch die Häufigkeit und damit die Frequenz im Vergleich zu den SNPs sehr gering ist. Ändert eine Basensubstitution ein Kodon auf der DNA

derart, dass im Protein nicht eine andere Aminosäure vorkommt, wird dies synonym genannt. Eine Basensubstitution, die den Einbau einer anderen Aminosäure in ein Protein verursacht, heißt nicht-synonym. Wird ein Kodon durch ein Stop-Kodon ersetzt, so wird von einer Nonsense-Mutation gesprochen. Neben Mikrosatelliten eignen sich auch SNPs für Kopplungsanalysen in Familienstammbäumen oder für Assoziationsstudien in Populationen, die auf das Kopplungsungleichgewicht zurückgreifen, um eine gemeinsame Vererbung des Markers mit einem möglichen Krankheitsgen bzw. Krankheitslokus zu finden (Kruglyak 1997). Hier haben SNPs als Marker keinen funktionellen Bezug zum klinischen Merkmal. Bei besonders enger Kopplung oder bei Mutationen, die selten in der Bevölkerung auftreten, findet man bei Betroffenen bevorzugt eine bestimmte allelische Kombination benachbarter Marker (Haplotyp). SNPs als Marker haben gegenüber Mikrosatelliten den Nachteil, dass sie nicht polymorph sind, sondern nur in zwei allelischen Variationen vorkommen, jedoch den Vorteil, sehr dicht über das Genom verteilt zu sein (ca. 1 alle 1000 bp gegenüber 1 zu 30.000 bp). Biallelische SNPs stellen aufgrund ihrer Häufigkeit im Genom, ihrer niedrigen Mutationsrate und der Möglichkeit zum automatisierten Nachweis eine gute Markerwahl dar, um nach Genen, die zu komplexen Erkrankungen führen, zu suchen (Cronin *et al.* 1996; Kruglyak 1999). Sie können somit als Werkzeug dienen, um multifaktorielle polygene Erkrankungen wie z. B. Hypertonie, Diabetes oder auch andere Merkmale wie das Übergewicht besser zu verstehen (Ott *et al.* 2001). Während SNPs als Marker eingesetzt werden, können cSNPs, die innerhalb von kodierenden DNA-Abschnitten liegen, zu veränderten Genprodukten führen. Die Assoziation kann dann auf einem funktionellen Zusammenhang zwischen Gen-Polymorphismus und Krankheit beruhen (Zhao *et al.* 1998; Cargill *et al.* 1999). cSNPs werden daher als prädisponierende genetische Faktoren für häufige Krankheiten angenommen (Halushka *et al.* 1999). Eine funktionelle Assoziation stellt z. B. die ApoE-4-Variante mit dem Risiko für die späte Form der Alzheimer-Krankheit dar (Martin *et al.* 2000). Apolipoprotein E (ApoE) ist ein Plasmaprotein, welches eine zentrale Rolle als Ligand für die Rezeptor-vermittelte zelluläre Aufnahme von Lipoproteinpartikeln spielt. Es wird nicht nur in der Leber, sondern auch im Gehirn synthetisiert. Das ApoE-Gen liegt auf Chromosom 19 und kann in 4 verschiedenen Varianten vorliegen. Die Assoziation der ApoE-4-Variante mit der Alzheimer-Krankheit wurde in einer großen Studie durch Kopplung von SNPs nachgewiesen. Zu beiden Seiten des Genortes ApoE wurde eine hochauflösende SNP-Karte angefertigt und diese SNPs bei Alzheimer-Patienten sowie

gesunden Kontrollgruppen untersucht (Roses 2000). Pharmakogenetische Untersuchungen können durch den Einsatz von SNPs in der Medikamentenentwicklung zunehmend an Bedeutung gewinnen, da so eine individuelle Medikamentenbehandlung des Patienten realisierbar wäre (Roses 2000 a; Roses 2000 b). Dies würde bedeuten, das richtige Medikament beim individuellen Patienten mit der richtigen Dosis nach einem Gen-basierenden Diagnostiktest zu verabreichen. Kopplungs- und Assoziationsanalysen können nicht nur bei betroffenen Patienten, sondern auch bei gesunden, nicht-betroffenen Personen durchgeführt werden. Um den jeweiligen Beitrag von Genen und Umwelt bei der variablen Ausprägung von komplexen Merkmalen festzustellen, werden unter anderem Ähnlichkeiten zwischen Familienmitgliedern, Voll- und Halbgeschwistern sowie Zwillingen für Assoziationsanalysen herangezogen. Zwillinge stellen eine gute Probenwahl dar, weil sie gleich alt sind und sehr ähnlichen Umweltbedingungen ausgesetzt sind. Genetische Faktoren werden über die Konkordanz von ein- und zweieiigen Zwillingen verglichen (Busjahn *et al.* 2003). Als Konkordanz wird der Anteil der Zwillingspaare bezeichnet, bei denen die beiden Geschwister die gleiche Merkmalsausprägung haben. Sind eineiige Zwillinge für ein Merkmal in höherem Maße konkordant (d. h. im höherem Maße die gleiche Merkmalsausprägung zeigen) als die zweieiigen Zwillinge, so ist die Merkmalsvariation durch genetische Faktoren beeinflusst. Für quantitative Maße wie den Blutdruck wird die Merkmalskorrelation verglichen. Die Analyse von SNPs gewinnt nicht nur in der Grundlagenforschung, sondern auch in der Routinediagnostik zunehmend an Bedeutung und ist somit ein wichtiger Bestandteil der molekularbiologischen Forschung.

1.3 Nachweisverfahren von Mutationen und Polymorphismen

Für die Detektion und Diskriminierung von Mutationen und genetischen Variationen gibt es eine Vielzahl von unterschiedlichen Methoden und Verfahren. Eine Einteilung dieser Nachweisverfahren kann unter verschiedenen Gesichtspunkten erfolgen wie z. B. hinsichtlich ihrer Sensitivität, Spezifität, Kosten, Durchsatz, Automatisierbarkeit und anderen Eigenschaften. Nach der zugrunde liegenden Methodik können die Nachweisverfahren in Gruppierungen von (i) bis (vi) eingeteilt werden:

-
- (i) Enzymatische Methoden, in der die Eigenschaften spezieller Enzyme genutzt werden, um bestimmte Nukleotide zu erkennen. Neben Restriktionsenzymen werden Ligasen (Baron *et al.* 1997) oder Cleavasen und Resolvasen (Chen *et al.* 1998) verwendet, um die speziellen Eigenschaften dieser Enzyme einzusetzen. DNA-Polymerasen ohne 3'-5' Korrektur-Funktion werden meistens eingesetzt, um durch eine Allel-Spezifische-PCR (ASP) (Liu *et al.* 1997) Basensubstitutionen nachzuweisen.
 - (ii) Elektrophoretische Methoden, in denen die allelische Diskriminierung durch das Mobilitätsverhalten der Nukleotide nachgewiesen werden kann. Hierzu zählen vor allem der Single-Strand-Conformation-Polymorphism (SSCP) Nachweis (Orita *et al.* 1989 a; Orita *et al.* 1989 b), die Heteroduplex-Analysen (HD) (Keen *et al.* 1991; Grompe 1993) und die Denaturierende Gradienten-Gel-Elektrophorese (DGGE) (Myers *et al.* 1985). Nach der direkten DNA-Sequenzierung mit der Didesoxynukleotid-Methode (Sanger *et al.* 1977) folgt die Auftrennung von DNA-Molekülen ebenfalls mit einer Elektrophorese.
 - (iii) Festphasendeterminierung von allelischen Varianten durch Hybridisierung an Microarrays oder sogenannten „high-density oligonucleotide arrays“. Bei diesen Chip-Methoden können mehrere Polymorphismen in einem Experiment bestimmt werden. Hybridisiert werden Farbstoffmarkierte-Produkte von Minisequenzierungsreaktionen (Syvanen 1999) oder Ligasereaktionen (Gunderson *et al.* 1998; Marshall *et al.* 1998), welche mit auf Chip immobilisierten Oligonukleotiden DNA-Doppelstränge bilden.
 - (iv) Chromatographische Methoden wie z. B. die denaturierende Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie (DHPLC) (Huber *et al.* 1993; Gallo *et al.* 2002), bei der die Säulenaufenthaltszeit einer Heteroduplex-DNA, verursacht durch einen Mismatch zwischen DNA-Molekülen, bestimmt wird.
 - (v) Differentielle Massen-Spektrometrie, in der die physikalische Eigenschaft der Masse eines DNA-Moleküls als Maß zur Bestimmung der allelischen Varianz eingesetzt wird. Bei der „Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight“ (MALDI-TOF) oder auch der „Electrospray ionization“ (ESI-MS) Massen-Spektrometrie werden mittels eines Laserstrahls ionisierte Gas-Phase-DNA-Moleküle in einem elektrischen Feld beschleunigt, welche in einer Vakuum-Kammer auf einen Detektor treffen (Griffin *et al.* 2000). Aus der Flugzeit wird die Masse eines DNA-Moleküls bestimmt (Ross *et al.* 1998).

(vi) Fluoreszenz-gekoppelte Nachweisverfahren, bei der die Emission durch „Fluoreszenz resonance energy transfer“ (FRET) unterdrückt wird. Bei dem „5'- nuclease assay“ bzw. TaqMan werden mit zwei allelspezifischen doppelmarkierten Sonden (Livak 1999), oder sogenannten „molecular beacons“ (Tyagi *et al.* 1996) oder „scorpions“ während einer Amplifikation der DNA Varianz-entsprechende Fluoreszenzsignale gemessen. Neben Fluoreszenzsignalen werden auch Lichtblitze wie bei der Pyrosequenzierung für den Nachweis von SNPs genutzt (Ronaghi *et al.* 2002).

Bei den meisten der dargestellten Methoden handelt es sich um kombinierte Verfahren. So werden PCR-Produkte eingesetzt, die dann als Ausgangsmaterial für weitere Techniken benutzt werden (Abbildung 1). Eine alternative Methode zum direkten Nachweis von DNA-Variationen unter Umgehung einer PCR stellt die Invader-Technik dar (Olivier *et al.* 2002).

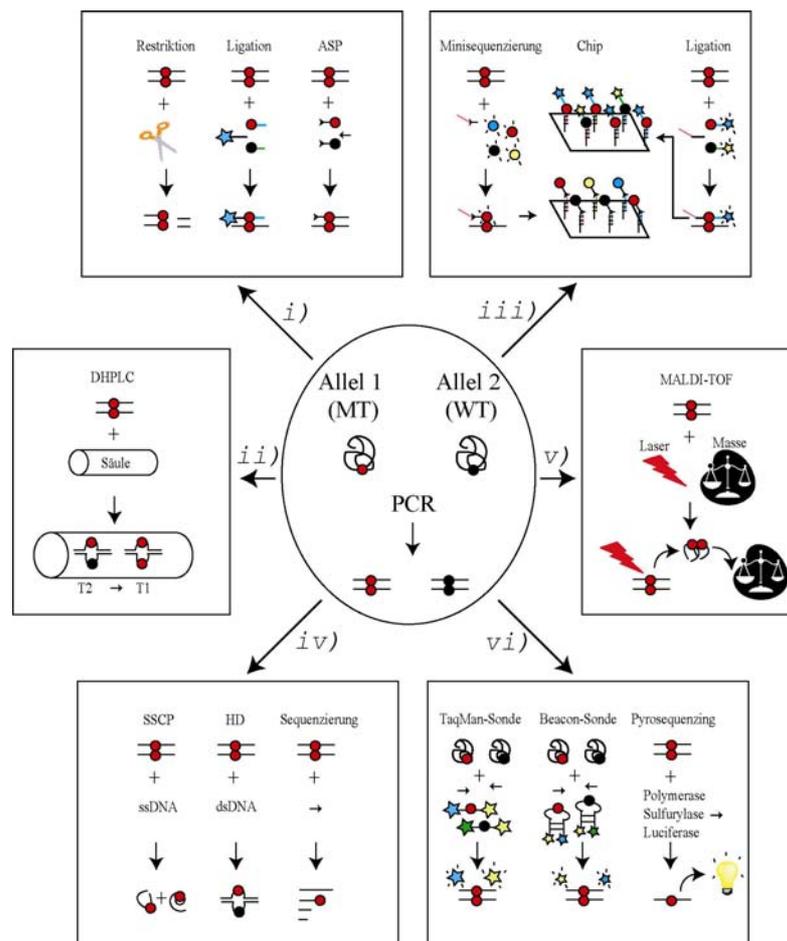


Abbildung 1: Schematische Darstellung unterschiedlicher Methoden für den Nachweis von genetischen Variationen. Die Verfahren sind, abhängig von verschiedenen physikalischen Eigenschaften, in sechs Gruppen eingeteilt (i-vi). Bei allen dargestellten Methoden wird die PCR direkt oder indirekt für eine Genotypisierung eingesetzt. Für eine Vereinfachung ist in den meisten Fällen nur das „Mutante“ Allel (MT) dargestellt.

1.4 Familiäre Hypercholesterinämie

Die Familiäre Hypercholesterinämie (FH) ist eine der häufigsten angeborenen Stoffwechselstörungen des Menschen. Die FH ist durch erhöhte Serumcholesterinwerte, Sehnenxanthome und vorzeitige koronare Herzerkrankung (KHK) (Goldstein *et al.* 1995; Vergopoulos *et al.* 1997) charakterisiert. Einer KHK liegt in der Regel eine Arteriosklerose der Herzkranzgefäße zugrunde (Lusis 2000). Zu den Risikofaktoren für das Auftreten einer KHK gehören neben einer positiven Familienanamnese und einer arteriellen Hypertonie die Hypercholesterinämie; wesentlich dabei ist die Erhöhung der Low-Density-Lipoprotein (LDL)-Konzentration. Verursacht wird die Familiäre Hypercholesterinämie, die einem autosomal dominanten Erbgang folgt, durch Mutationen im LDL-Rezeptor-Gen. Menschen, die an einer FH erkrankt sind, können überschüssiges Cholesterin nicht in ihrer Leber abbauen (Brown *et al.* 1986). Der Grund liegt darin, dass das Cholesterin, das im Blut an LDL (Low-Density-Lipoprotein) gebunden ist, nicht durch den LDL-Rezeptor aufgenommen werden kann. Durch Aufnahme von LDL aus dem Plasma versorgt der Rezeptor die Zelle mit Cholesterin (Abbildung 1.1). Somit führt eine gestörte LDL-Rezeptor-Funktion zu einer verminderten Aufnahme von LDL und damit zu einer Anhäufung von LDL im Plasma (Goldstein *et al.* 2001). An der Oberfläche der LDL-Partikel ist das Apolipoprotein-B lokalisiert, das zur Bindung an den LDL-Rezeptor benötigt wird. Mutationen im Apolipoprotein-B-Gen können daher ein ähnliches Krankheitsbild hervorrufen. Das Low-Density-Lipoprotein-Cholesterin (LDL-C) nimmt bei der Entstehung der Arteriosklerose eine zentrale Rolle ein und ist einer der Hauptrisikofaktoren für den Herzinfarkt (Garcia *et al.* 2001). Die FH ist eine der häufigsten monogenen Erkrankungen, Die Prävalenz der heterozygoten Form liegt bei 1:500 und die seltenere homozygote Form bei 1:1.000.000 (Goldstein *et al.* 2001). In einigen Populationen tritt die FH mit höheren Frequenzen von bis zu 1:67 auf (Reich *et al.* 2001). Die hohe Prävalenz in einigen Bevölkerungsgruppen ist auf einen sogenannten Gründereffekt zurückzuführen, bei dem die Menschen über einen längeren Zeitraum isoliert lebten (Mandelstam *et al.* 1998). Die klinische Erscheinungsform der FH ist abhängig von der Art der Mutation sowie vom Alter und Geschlecht des Patienten (Gudnason *et al.* 1994). Durch die Untersuchung des Gendefektes im LDL-Rezeptor kann bereits vor dem Auftreten schwerer Gefäßschäden das individuelle Risiko erhoben werden (Umans-Eckenhausen *et al.* 2001). Die Vielzahl der bekannten und zu testenden Mutationen,

bisher sind ca. 700 Mutationen beschrieben (Villegier *et al.* 2002), sowie die große Wahrscheinlichkeit der Existenz weiterer bisher unbekannter Mutationen stellen dabei extreme Anforderungen an einen Gentest für FH. Betroffene können durch eine rechtzeitige Diagnose gezielt und vorbeugend mit cholesterinsenkenden Medikamenten behandelt werden.

1.4.1 Der LDL-Rezeptor

Das LDL-Rezeptor-Gen ist auf dem distalen kurzen Arm von Chromosom 19 lokalisiert und umfasst einen ca. 45 kb großen Bereich. Das gesamte Gen besteht aus 18 Exons, die für ein einkettiges Glykoprotein von 839 Aminosäuren kodieren (Abbildung 1.1) (Yamamoto *et al.* 1984; Sudhof *et al.* 1985). Die ersten 21 Aminosäuren werden von Exon 1 kodiert, die nach der Translation abgespalten werden. Die Exons 2 bis 6 kodieren für eine Ligandenbindungsregion. Diese Domäne enthält 292 Aminosäuren, die überwiegend negativ geladen sind und die Rezeptor-Liganden-Bindung mit den positiv geladenen Bindungsdomänen der Apolipoproteine vermitteln. Die Exons 7 bis 14 kodieren eine Proteindomäne, die aus 400 Aminosäuren besteht. Diese Region, die eine hohe Sequenzhomologie zu dem epidermalen Wachstumsfaktor aufweist, wird für die Dissoziation des Lipoproteins vom Rezeptor benötigt. Außerdem ist diese Domäne für die Positionierung an der Zelloberfläche wichtig, so dass sie als Bindungsregion für LDL dienen kann. Die Bindungsstelle für Kohlenhydrate wird durch das Exon 15 kodiert. Die aus dem Exon 15 stammenden 58 Aminosäuren ragen aus der Zelloberfläche heraus. Exon 16 und der 5'-Bereich von Exon 17 kodieren einen Abschnitt von 22 Aminosäuren, der den LDL-Rezeptor in der Zellmembran verankert. Das 3'-Ende von Exon 17 und das 5'-Ende des Exon 18 kodieren einen Abschnitt von 38 Aminosäuren der cytoplasmatischen Region, die die Formation von „coated pits“ vermittelt. Der Rest von Exon 18 kodiert die letzten 12 Aminosäuren der cytoplasmatischen Region und enthält die Information für einen 2,5 kb langen untranslatierten Bereich.

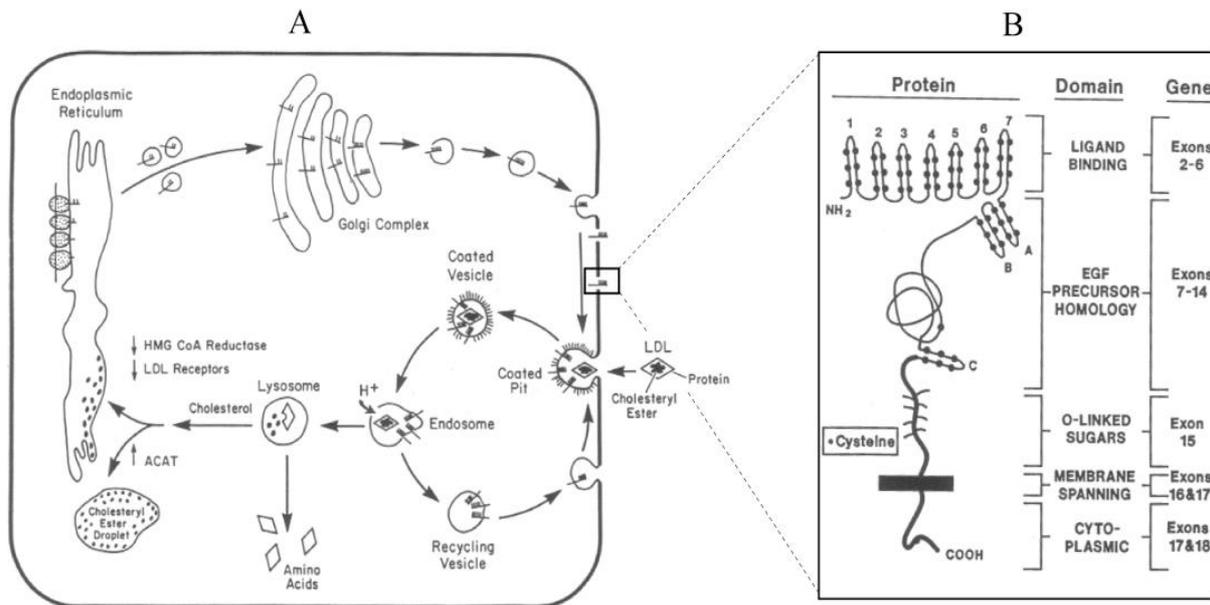


Abbildung 1.1: LDL-Cholesterin Aufnahme in kultivierten menschlichen Fibroblasten nach M. Brown und J. Goldstein (A). Das prä-LDL-Rezeptor-Protein wird an den Ribosomen des Endoplasmatischen Reticulums synthetisiert und verweilt innerhalb einer Zelle im Golgi Komplex, wo es weiter modifiziert wird. Die LDL-Rezeptoren wandern in spezialisierte Membranbereiche, den „coated pits“, die Clathrin enthalten. Dieser Bereich stülpt sich mit LDL-Cholesterin über Apolipoprotein B-100 und den LDL-Rezeptoren ein und verschmilzt zu einem Endocytosevesikel. Die „coated pits“ verlieren die Clathrinhülle und werden zu Endosomen umgewandelt. Die Endosomen haben eine saure Natur (H^+), die zur Dissoziation der Liganden-Rezeptor-Komplexe führt. Die so aufgenommenen LDL-Cholesterin-Partikel werden in der Zelle metabolisiert, während der LDL-Rezeptor zur Membran zurückkehrt. Die Endosomen (LDL-haltigen Vesikel) fusionieren anschließend mit den Lysosomen, die zahlreiche Verdauungsenzyme enthalten. Die Proteinkomponente des LDL (Apolipoprotein B) wird durch Proteasen zu freien Aminosäuren hydrolysiert. Das freigesetzte nicht veresterte Cholesterin wird für die Membranbiosynthese verwendet. Dadurch wird die LDL-Rezeptor-Synthese (\downarrow) unterdrückt und die Transkription des Gens für 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-CoA-Reduktase (HMG CoA Reduktase) (\downarrow), das für die Synthese des Cholesterins verantwortlich ist, gehemmt. Überschüssiges freigesetztes Cholesterin wird über die Acyl-CoA-Cholesterin-Acyl-Transferase (ACAT) (\uparrow) verestert und als Droplets in den Zellen gespeichert. Bei Bedarf kann Cholesterinester über die Cholesterinesterase wieder in freies Cholesterin umgewandelt und der Zelle zur Verfügung gestellt werden. Das LDL-Rezeptor-Gen besteht aus 18 Exons, welches ein Protein mit fünf verschiedenen Domänen kodiert, die unterschiedliche Funktionen aufweisen (B). Die Ligandenbindungsdomäne besitzt eine cysteinreiche Sequenz, die sich sieben mal wiederholt und negativ geladen ist. Diese reagiert mit der positiv geladenen Apolipoprotein B-100 Region des LDL-Cholesterins. Die zweite Domäne weist eine Homologie zum Epidermiswachstumsfaktor (EGF) auf. Sie wird benötigt, um die Ligandenbindungsdomäne zu positionieren und die pH-abhängige Dissoziation des Lipoproteins vom Rezeptor im Endosom zu bewerkstelligen. Die dritte Domäne enthält o-gebundene Kohlenhydratketten, die den Rezeptor von der Membran weggestreckt halten, damit die aminoterminale Domäne den LDL-Partikeln zugänglich ist. Die Membranspannungsdomäne verankert den LDL-Rezeptor in der Plasmamembran. Die fünfte zytoplasmatische Domäne vermittelt die Formation von „coated pits“ und ist an der Endozytose beteiligt.

1.5 Long-QT-Syndrom

Bei dem Long-QT-Syndrom (LQT-Syndrom) handelt es sich um eine Herzrhythmusstörung, die durch eine im Oberflächen-EKG nachweisbare Verlängerung der QT-Zeit charakterisiert ist (Schulze-Bahr *et al.* 1999). Die QT-Zeit bzw. das QT-Intervall repräsentiert die

Zeitspanne, die das Herz für die Kontraktion (Zusammenziehen) benötigt. Neben einer verlängerten QT-Zeit treten bei den Betroffenen Synkopen (kurzzeitige Bewusstseinsverluste) und ventrikuläre Tachykardien (Herzrasen) auf (Keating *et al.* 2001). Menschen, die an einem LQT-Syndrom leiden, können an einem plötzlichen Herztod sterben (Keating *et al.* 2001). Ein Teil der Fälle des plötzlichen Kindstodes werden dem LQT-Syndrom zugeschrieben (Schwartz *et al.* 1998). Die Erkrankung manifestiert sich bevorzugt in der Kindheit oder im jungen Erwachsenenalter. Generell wird zwischen einer kongenitalen (vererbten) und einer sporadischen (erworbenen) Form entschieden (Schulze-Bahr *et al.* 1999). Bei den meisten Fällen (80 bis 90 %) handelt es sich um die kongenitale Form, von der Familien betroffen sind. Schätzungen zufolge liegt die Häufigkeit bei ca. 1:5000 bis 1:10000 (Bezzina *et al.* 2002). Aufgrund unterschiedlicher Merkmale wird das LQT-Syndrom in zwei Formen unterschieden. Die autosomal-dominant vererbte Form des kongenitalen LQT-Syndroms wird als Romano-Ward-Syndrom, die seltenere autosomal-rezessive Variante, bei der zusätzlich eine Taubheit vorliegt, als Jervell-und-Lange-Nielsen-Syndrom bezeichnet (Schulze-Bahr *et al.* 1999; Schulze-Bahr *et al.* 2000). Das kongenitale LQT-Syndrom ist eine genetisch heterogene Erkrankung. Seit 1991 konnten in betroffenen Familien 6 Genorte, die auf den Chromosomen 3, 4, 7, 11, 17 und 21 liegen, nachgewiesen werden (Tabelle 1) (Schulze-Bahr *et al.* 1999; Keating *et al.* 2001; Behr *et al.* 2003; Kass *et al.* 2003).

Tabelle 1: QT-Syndrom – Einteilung nach molekulargenetischen Gesichtspunkten. I_{Kr} : schnell aktivierende Komponente des verzögerten Kalium-Gleichrichterstroms I_K ; I_{Ks} : langsam aktivierende. Der LQT4-Lokus war bekannt, jedoch wurde das verantwortliche Gen erst Anfang 2003 entdeckt (Mohler *et al.* 2003). Es ist das erste beschriebene Long-QT-Gen, das nicht einen Ionenkanal kodiert, sondern ein Adaptorprotein, welches Ionen-Transporter an spezielle Membrandomänen verankert (Nattel 2003). Der LQT7-Lokus wird dem Andersen Syndrom zugeschrieben. Das KCNJ2-Gen kodiert einen spannungsabhängigen K^+ -Kanal (Kir2.1) der neben Long QT auch plötzlich auftretende Paralysen verursacht (Plaster *et al.* 2001). Mutationen im SCN5A-Gen sind auch für das Brugada Syndrom verantwortlich.

Syndrom	Gen (alternativ Name)	Protein	Lokalisation	Genprodukt
LQT1	KCNQ1 (KVLQT1)	KvLQT1	11p15.5	Kanalprotein (α -Untereinheit von I_{Ks})
LQT2	HERG (KCNH2)	HERG	7q35-36	Kanalprotein (α -Untereinheit von I_{Kr})
LQT3	SCN5A	SCN5A	3p21-24	Kanalprotein (α -Untereinheit von I_{Na})
LQT4	ANKB (ANK2)	ANKB	4q25-q27	Ankyrin B
LQT5	KCNE1	minK	21q22	Kanalprotein (β -Untereinheit von I_{Ks})
LQT6	KCNE2	MIRP1	21q22	Kanalprotein (β -Untereinheit von I_{Kr})
LQT7	KCNJ2	Kir2.1	17q23	Kanalprotein (I_{Ki})

1.5.1 Long-QT-Syndrom-Gene

Für das Long-QT-Syndrom konnten die ursächlichen Gene KCNQ1, HERG, SCN5A, KCNE1 und KCNE2 identifiziert werden (Schulze-Bahr *et al.* 1999). Bei allen Fällen handelt es sich um Gene, die für Ionenkanäle bzw. deren Untereinheiten kodieren (Tristani-Firouzi *et al.* 2001; Roden *et al.* 2002). KCNQ1 besteht aus 16 Exons und kodiert eine spannungsabhängige α -Untereinheit eines Kaliumkanals (K^+) (Splawski *et al.* 1998). KCNE1 hat 3 Exons und verschlüsselt eine spannungsabhängige β -Untereinheit eines Kaliumkanals (K^+) (Splawski *et al.* 1998). Das minK (KCNE1)-Protein bildet mit dem KvLQT1 (KCNQ1)-Protein zusammen einen nativen kardialen Kalium (K^+)-Kanal, der für den langsamen Auswärtsstrom von K^+ (I_{Ks}) verantwortlich ist. Das HERG-Gen besitzt 15 Exons, die eine spannungsabhängige α -Untereinheit eines Kaliumkanals (K^+) kodieren, der für den schnellen repolarisierenden K^+ -Auswärtsstrom (I_{Kr}) und das Beenden des Aktionspotentials verantwortlich ist (Splawski *et al.* 1998). Das HERG-Gen kann alternativ gespleißt werden. Das KCNE2-Gen hat eine hohe Homologie zum KCNE1, besitzt jedoch nur 2 Exons, die eine spannungsabhängige β -Untereinheit eines Kaliumkanals (K^+) kodieren. Die α -Untereinheit von HERG ist mit der β -Untereinheit von KCNE2 assoziiert, so dass sie sich zu einem funktionellen Kaliumkanal-Protein formieren und einen schnellen K^+ -Auswärtsstrom (I_{Kr}) ausüben kann. Das aus 28 Exons bestehende SCN5A Gen kodiert für eine α -Untereinheit eines Natriumkanals (Na^+) (Wang *et al.* 1996). Durch einen schnellen Einstrom von Na^+ initialisiert der SCN5A-Kanal die Depolarisierung (Luft 2001). Bei den ursächlichen LQT-Syndrom-Genen führen Veränderungen myokardialer Ionenkanäle zu einer Verlängerung der Aktionspotentialdauer (Abbildung 1.2). Im EKG ist dies an einer verlängerten QT-Zeit messbar. Die integralen Membranproteine von KCNQ1 und HERG besitzen eine vergleichbare Struktur. Beide haben 6 Transmembrandomänen, die sich zu einem tetrameren Kanal zusammenlagern, und eine P-Domäne, die eine Kanalpore auskleidet. Die Eigenschaft der beiden Kanäle wird durch die Assoziation mit zusätzlichen regulatorischen β -Untereinheiten der KCNE1 und KCNE2 beeinflusst, um einen funktionellen Kanal zu bilden. Das SCN5A-Protein besteht aus 4 Domänen, die jeweils 6 Transmembransegmente aufweisen. Die meisten Mutationen wurden bei betroffenen Patienten in dem KCNQ1- und HERG-Gen und die seltensten im SCN5A-Gen sowie den beiden KCNE1- und KCNE2-Genen entdeckt. Defekte in den KCNE1- und KCNE2-Genen bewirken mildere kardiale

LQT-Phänotypen als Mutationen in den restlichen drei Genen. Während viele Mutationen in Genen des LQT-Syndroms bekannt und beschrieben wurden, sind die allelischen Varianten (Polymorphismen), die die Variabilität des Phänotyps im Normalbereich beeinflussen, im wesentlichen unbekannt.

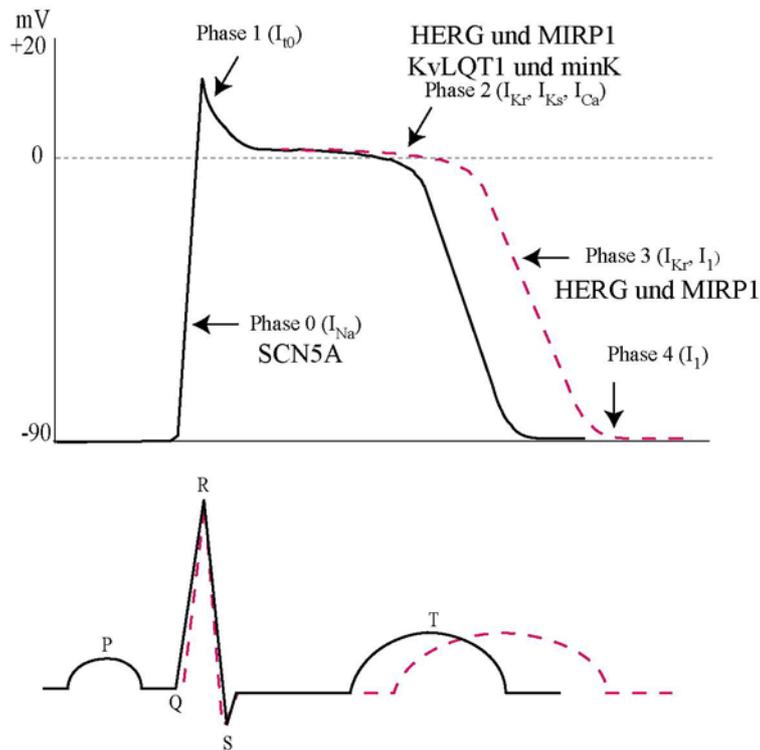


Abbildung 1.2: Vereinfachte Darstellung des kardialen Aktionspotentials mit den involvierten Long-QT-Genen (oben) und ihre Auswirkung auf das QT-Intervall im EKG (unten). Für den Aufbau des Aktionspotentials sind verschiedene Ionenkanäle (SCN5A, HERG, MIRP1, KvLQT1, minK und andere) beteiligt. Diese ermöglichen für das jeweils betreffende Ion (Na, K und andere) das Erreichen des Gleichgewichtszustandes und das Verschieben des Ruhepotentials hin zum Gleichgewichtspotential. Das koordinierte Öffnen und Schließen der jeweiligen Ionenkanäle ist wichtig für eine kardiale Erregbarkeit (schwarz). Veränderungen in den Ionenkanälen durch z. B. Mutationen, können die Depolarisierung und Repolarisierung der Herzzellen verändern, was sich im EKG durch eine verlängerte QT-Zeit darstellt (rot). Phasen 0 – 4: Aktionspotentialphasen.