

Experimental & Clinical Research Center (ECRC)
am Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin
der Medizinischen Fakultät Charité - Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Genetische Analyse des LMNA-Gens, kodierend für Lamin A/C,
bei Patienten mit Hypertropher Kardiomyopathie und
Non-Compaction Kardiomyopathie

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité - Universitätsmedizin Berlin

von
Maraike Neubert
aus Elsterwerda

Datum der Promotion: 25.10.2013

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	IV
1 Einleitung	1
1.1 Kardiomyopathien	1
1.1.1 Definition und Klassifikation	1
1.1.2 Hypertrophe Kardiomyopathie	2
1.1.3 Linksventrikuläre <i>Non-Compaction</i> Kardiomyopathie	5
1.1.4 Familiäre dilatative Kardiomyopathie und deren genetische Ursachen	9
1.2 Lamin A/C als Teil der Laminfamilie	10
1.2.1 Systematisierung und Lokalisation der Lamine	10
1.2.2 Genetischer Aufbau und Proteinstruktur von Lamin A/C	11
1.2.3 Lamin A/C - Funktion und -Interaktion mit anderen Proteinen	12
1.2.4 Genotyp-Phänotyp-Korrelation und pathogenetische Erklärungsmodelle	14
1.2.5 Laminopathien	15
2 Zielsetzung	16
3 Material und Methoden	17
3.1 Chemikalien	17
3.2 Geräte	18
3.3 Sonstige Materialien	19
3.4 Verwendete Computerprogramme	19
3.4.1 OLIGO 4.0	19
3.4.2 SEQUENCHER 4.1	19
3.4.3 RESCUE-ESE	20
3.5 Patientenkollektive	20
3.6 DNA-Extraktion	20
3.7 Polymerasekettenreaktion	21
3.7.1 Konstruktion der Primer und Festlegung der Annealingtemperatur . .	21
3.7.2 Standard-PCR	22
3.7.3 Durchführung der PCR	23
3.7.4 Optimierung der PCR	24

3.7.5	<i>Touchdown</i> -PCR	24
3.8	Gelelektrophorese	25
3.9	Sequenzierung	27
3.9.1	Zyklussequenzierung/ <i>thermal cycle sequencing</i>	27
3.9.2	Durchführung der Sequenzierung	28
3.10	Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus	29
3.10.1	Definition	29
3.10.2	Durchführung	30
4	Ergebnisse	31
4.1	Übersicht der einzelnen Arbeitsschritte	31
4.2	Ergebnisse der PCR	31
4.2.1	Grundsätze der Optimierung	31
4.2.2	Festlegung der T_A und Kontrolle des PCR-Produkts anhand von Exon 9	32
4.2.3	Optimierung schwacher Banden am Beispiel von Exon 8	33
4.2.4	Optimierung unspezifischer Nebenprodukte anhand von Exon 12	34
4.2.5	Erhöhung der Spezifität durch Verwendung einer <i>Touchdown</i> -PCR am Beispiel von Exon 1	35
4.3	Ergebnisse der Sequenzierung	37
4.3.1	Übersicht der Ergebnisse	37
4.3.2	Probleme der Sequenzierung	37
4.3.3	Bekannte SNPs	38
4.3.4	Neue <i>silent</i> -Varianten	44
4.3.5	Neue Missense-Mutationen	47
4.4	Ergebnisse der RFLP	51
4.5	Zusammenfassung der Ergebnisse	55
5	Diskussion	57
5.1	Überblick	57
5.2	Methoden	57
5.3	Polymorphismen und ihr Einfluss auf den Phänotyp	58
5.4	Neue synonyme Varianten	59
5.5	Fehlende Mutationsnachweise bei Patienten mit LVNC	59

5.6	Auswirkungen der Missense-Mutationen auf genetischer Ebene	60
5.7	Mögliche Auswirkungen auf die Pathogenese der HCM	63
5.8	Fazit und ein Ausblick in die Zukunft	69
6	Zusammenfassung	71
	Literatur	73
	Abbildungsverzeichnis	89
	Tabellenverzeichnis	90
A	Anhang	91
A.1	Anhang HCM	91
A.2	Anhang Material Methoden	92
	Danksagung	93
	Lebenslauf	94
	Publikationen	94
	Selbstständigkeitserklärung	95

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenosin
AHA	<i>American Heart Association</i>
AP	Angina Pectoris
ARVC	Arrhythmogene rechtventrikuläre Kardiomyopathie
AS	Aminosäure
AV-Block	Atrioventrikular-Block
bp	Basenpaar
C	Cytosin
dbSNP	<i>Database for Single Nucleotide Polymorphisms</i>
DCM	Dilatative Kardiomyopathie
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphate
ddNTP	Didesoxynukleotidtriphosphate
EDMD	Emery Dreifuß Muskeldystrophie
EF	Ejektionsfraktion
ESC	<i>European Society of Cardiology</i>
ESP	<i>Exome Sequencing Project</i>
EVP	Europäische Vergleichspopulation
fDCM	Familiäre Dilatative Kardiomyopathie
FPLD	Familiäre partielle Lipodystrophie
G	Guanin
HCM	Hypertrophe Kardiomyopathie
HGPS	Hutchinson Gilford Progerie Syndrom
HOCM	Hypertrophe Obstruktive Kardiomyopathie
HRST	Herzrhythmusstörungen
ICD	Implantierbarer Kardioverter/ Defibrillator
iDCM	Ideopathische Dilatative Kardiomyopathie
IF	Intermediärfilament
<i>Ig-like</i>	<i>Immunglobulin-like</i>
INM	Innere Kernmembran

K ₁	Kollektiv 1 (selektierte HCM-Patienten)
K ₂	Kollektiv 2 (nicht-selektierte HCM-Patienten)
K ₃	Kollektiv 3 (NC-Patienten)
KM	Kardiomyopathie
LAP2 α	Laminassoziertes Protein 2 α
LGMD	Limb Girdle Muskeldystrophie
LV	Linksventrikulär
LVNC	Linksventrikuläre <i>Non-Compaction</i> Kardiomyopathie
MVIII	Molekulargewichtsmarker Typ VIII
NC	<i>Non-Compaction</i>
NPC	Kernporenkomplex
NYHA	<i>New York Heart Association</i>
ONM	Äußere Kernmembran
PCR	Polymerasekettenreaktion
Primer F	<i>forward</i> Primer
Primer R	<i>reverse</i> Primer
Rb	Retinoblastom-Protein
RCM	Restriktive Kardiomyopathie
RFLP	Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus
RNA	Ribonukleinsäure
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
SREBP1	<i>sterol response element binding protein 1</i>
T	Thymin
T _A	Annealingtemperatur
T _M	Schmelztemperatur
TBE	TRIS-Borat-EDTA
TF	Transkriptionsfaktor
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan

1 Einleitung

1.1 Kardiomyopathien

1.1.1 Definition und Klassifikation

Seit der ersten Definition der *International Society and Federation of Cardiology* der *World Health Organisation* im Jahr 1980, in der Kardiomyopathien (KM) als “*heart muscle diseases of unknown cause*” [WHO/ ISFC 1980, S.1] bezeichnet wurden, sind durch diagnostische und molekulargenetische Fortschritte grundlegende Erkenntnisse gewonnen worden. KM sind eine sehr heterogene Gruppe von Erkrankungen, wodurch es Unstimmigkeiten über eine einheitliche Definition, Klassifikation und den Ein- und Ausschluss bestimmter Erkrankungen gibt. Die Definition der *European Society of Cardiology (ESC)* soll hier als ein Beispiel dienen: “*myocardial disorder in which the heart muscle is structurally and functionally abnormal, in the absence of coronary artery disease, hypertension, valvular disease and congenital heart disease*” [Elliot 2007, S.2]. Klinisch stellt sich dies meist durch eine Dilatation und/oder Hypertrophie des Herzens und ein *remodeling* der Kardiomyozyten dar. Zu den Folgen zählen Herzinsuffizienz, Arrhythmien, bis hin zum plötzlichen Herztod. Die Ursachen sind noch nicht bis ins Detail geklärt, weswegen die Erfassung genetischer Grundlagen gegenwärtig Bestandteil zahlreicher Forschungen ist [Pankuweit 2008, Maron 2006].

Im Folgenden werden die zwei wichtigsten Klassifikationsschemata kurz vorgestellt. Die Klassifikation der *ESC*, welche in erster Linie auf morphologischen und funktionellen Gesichtspunkten beruht, ist für die klinische Praxis besonders wichtig. Es wird zwischen Hypertropher (HCM), Dilatativer- (DCM), Arrhythmogener rechtsventrikulärer- (ARVC), Restriktiver- (RCM) und nicht-klassifizierbarer KM unterschieden. Danach erfolgt jeweils die Unterteilung in familiär/genetisch und nicht-familiär/nicht-genetisch. Familiär bedeutet, dass es mehr als ein betroffenes Familienmitglied gibt, dass ein weiteres Familienmitglied die gleiche Mutation trägt oder eine de novo Mutation mit der Möglichkeit zur Vererbung vorliegt [Elliot 2007, Elliot 2008]. Durch gemischte Phänotypen, wie RCM mit hypertrophen Anteilen, oder fließenden Übergängen einzelner Subtypen, z.B. ein hypertrophes Herz, das sekundär dilatiert, ist eine klare Zuteilung nicht immer möglich [Elliot 2007, Maron 2008/1]. Die *American Heart Association (AHA)* publizierte 2006 eine neue Klassifikation (Abb. 1.1), deren Schwerpunkt auf den molekulargenetischen Erkenntnissen liegt. Unterschieden werden: Primäre KM, die nur oder hauptsächlich das Myokard betreffen und sekundäre KM, deren

pathologische Myokardveränderung Teil einer systemischen Erkrankung ist, z.B. Amyloidose, Morbus Fabry, Sarkoidose oder Diabetes mellitus [Maron 2006, Pankuweit 2008].

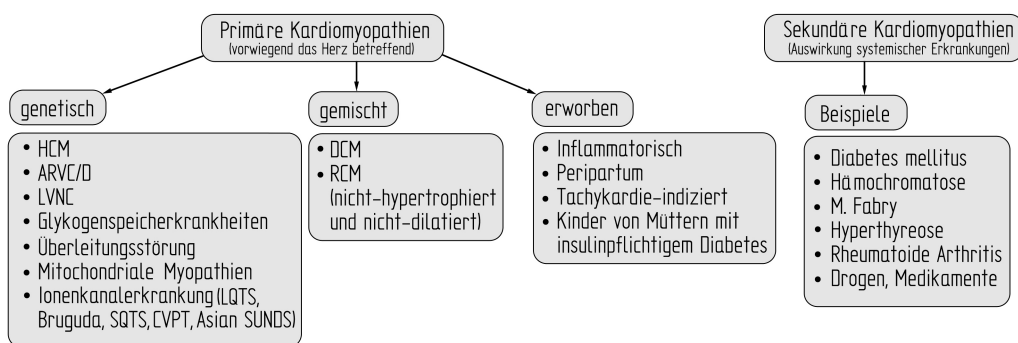


Abbildung 1.1: AHA-Klassifikation der Kardiomyopathien. Modifiziert nach [Maron 2006].

Die Linksventrikuläre *Non-Compaction* Kardiomyopathie (LVNC) gilt hier nicht als unklassifiziert, sondern zählt zu den genetisch bedingten KM [Pankuweit 2008, Maron 2006]. Myokardiale Veränderungen, wie Hypertonie, Herzklappenerkrankungen, angeborene Herzfehler oder Koronarsklerose, die zum Teil als ischämische KM bezeichnet wurden, gehören weder zur *AHA*- noch zur *ESC*-Klassifikation [Elliot 2008, Maron 2006, Maron 2008/1]. Künftiges Ziel ist die Schaffung einheitlicher diagnostischer Richtlinien und die Implementierung genetischer Untersuchungen in die Klinik [Pankuweit 2008]. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit den genetischen Ursachen der KM, speziell wurden Patienten mit HCM und Patienten mit LVNC auf Mutationen im Lamin A/C-Gen, einem der häufigsten Gene für familiäre DCM (fDCM), untersucht. Die folgenden Abschnitte geben einen Einblick in die Literatur.

1.1.2 Hypertrophe Kardiomyopathie

Definition und Klassifikation Die HCM ist mit einer Prävalenz von 1:500 die häufigste genetisch bedingte kardiovaskuläre Erkrankung [Maron 2008/2]. In Deutschland entspricht dies einer theoretischen Anzahl von 164.620 Betroffenen. Sie ist gekennzeichnet durch eine meist asymmetrische Verdickung des ventrikulären Myokards. Häufig sind das Ventrikelseptum und der linke Ventrikel betroffen. Die Hypertrophie entsteht ohne den Einfluss einer Druckbelastung, wie bei einer Aortenstenose, Hypertonie, Sport oder Hyperthyreose [Everett 2005, Maron 2008/2, Semsarian 2007]. Zudem gibt es typische histologische Veränderungen, bestehend aus der Hypertrophie einzelner Myozyten, einer Unordnung der Myofibrillen (disarray) und einer interstitiellen Fibrose [Semsarian 2007]. Abbildung 1.2 stellt ein gesundes und ein hypertrophes Herz gegenüber. Die internationale Klassifikation der

Krankheiten unterscheidet zwischen Hypertrophischer obstruktiver KM (Kapitel IX; Gruppe I42.1) und Hypertrophischer nichtobstruktiver KM (Kapitel IX; Gruppe I42.2) [ICD-10].

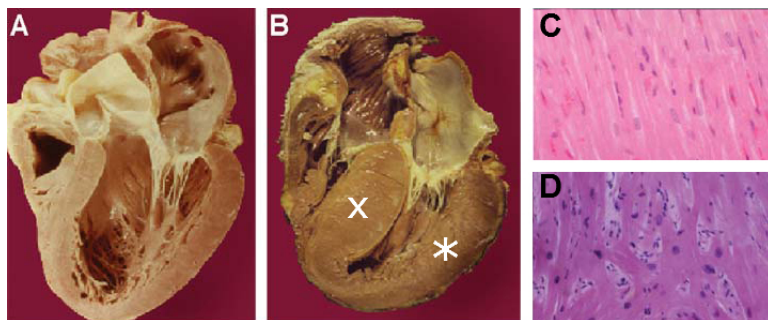


Abbildung 1.2: Makro- (A) mikroskopische (B) Gegenüberstellung eines gesunden und eines hypertrophen Herzens (B, D). Deutlich ist die Hypertrophie des interventrikulären Septums (x) und der linken Ventrikelwand (*). (D) *Disarray* der Kardiomyozyten mit interzellulärer Fibrose (Aufhellungen) [Ahmad 2005].

Genetische Ätiologie und mögliche Pathomechanismen HCM ist die erste kardiovaskuläre Erkrankung in der eine primär genetische Ursache festgestellt werden konnte [Geisterfer-Lowrance 1900]. Seither konnten über 450 Mutationen [Keren 2008] in 27 verschiedenen Genen identifiziert werden, die für Sarkomerproteine, Sarkomer assoziierte Gene und Proteine des kardialen Calciumstoffwechsels kodieren [Bos 2009]. Aus diesem Grund wird HCM auch als Sarkomererkrankung bezeichnet. Typisch für die HCM ist, dass die meisten Familien ihre eigene “private” Mutation tragen [McKenna 2012].

Die Erkrankung folgt einem autosomal-dominanten Erbgang [Elliot 2012, McKenna 2012]. Ungefähr 70 % der Mutationen befinden sich in den Genen der β -Myosin schweren Kette (MYH7) und des Myosin-bindenden Proteins C (MYBPC3), den zwei bedeutendsten HCM Krankheitsgenen [Kelly 2009, McKenna 2012]. Eine ausführliche Übersicht der HCM-Krankheitsgene, deren Häufigkeit und vorrangig assoziiertem Phänotyp gibt Tabelle 29 im Anhang. Bei Patienten ohne feststellbare Mutation (50 % [Alcalai 2008]) wird von einem Defizit der aktuellen Analysemethoden oder einer Mutation in einem bisher nicht identifizierten Krankheitsgen ausgegangen [Keren 2008]. In den letzten Jahren gab es eine Reihe anderer Gene, die fälschlicher Weise als HCM-Krankheitsgene deklariert wurden, da ihre Mutation ebenfalls zur Hypertrophie des Herzmuskels führen kann. Diese Phänokopien sind Bestandteil komplexer Stoffwechselerkrankungen mit Multiorganbeteiligung, z.B. dem Noonan’s Syndrom oder Glykogenspeichererkrankungen Typ II und III [Bos 2009, Keren 2008]. Trotz der typischen inter- und intrafamiliären Heterogenität bezüglich des Phänotyps, des Verlauf und der Penetranz lassen einige Genmutationen Aussagen über diese Parameter zu. Beispielswei-

se sind Mutationen im MYH7-Gen insgesamt mit einer mäßigen bis schweren Hypertrophie und einer hohen und frühen Penetranz assoziiert. Patienten mit Mutationen im TNNT2-Gen haben oft nur eine mäßige LV-Hypertrophie (13-20 mm), versterben aber häufiger an einem plötzlichen Herztod als Patienten mit MYH7-Mutation. Trotz dieser Korrelationen gibt es auch bei Patienten mit ein und derselben Mutation extreme klinische Variationen. Die individuelle Ausprägung wird zusätzlich durch den Lebensstil, Umwelteinflüsse, modifizierende Gene und verschiedene Polymorphismen beeinflusst [Keren 2008, McKenna 2012].

Auch die Anzahl an Mutationen beeinflusst den Verlauf der Erkrankung. So tragen ca. 5 % der Patienten zwei Mutationen. Sie zeichnen sich durch eine schwerere LV-Hypertrophie, einen früheren Beginn und eine höhere Inzidenz an plötzlichem Herztod aus. Es wird zwischen Homozygoten - Befall zweier Allele, *compound* Heterozygoten - zwei verschiedene Mutationen innerhalb eines Gens und doppelten Heterozygoten - Veränderungen zwei verschiedener Gene, unterschieden [Kelly 2009, McKenna 2012]. Die präzisen Pathomechanismen, die letztendlich zur Hypertrophie führen, sind nicht geklärt. Zu den wichtigsten Theorien gehören die Entstehung eines *poison peptid* mit dominant-negativer Wirkung gegenüber dem Wildtypprotein und die Entstehung eines haploinsuffizienten Proteins, durch den Funktionsverlust eines Allels. Die Mehrzahl der Mutationen sind *missense*-Mutationen [Alcalai 2008, Keren 2008]. Tierversuche zeigen kontroverse Ergebnisse hinsichtlich Veränderungen des Aktinfilamentgleiten durch MYH7-Mutationen und der daraus resultierenden Hypertrophie [Sata 1996, Tyska 2000]. Die derzeitige Forschung arbeitet intensiv an der Aufdeckung der Pathomechanismen, der Identifikation neuer HCM-Gene und modifizierender Faktoren der Genexpression. Die Störung der Calciumhomöostase zwischen Sarkomer und sarkoplasmatischem Retikulum scheint dabei eine große Rolle zu spielen [Ahmad 2005]. Ebenfalls diskutiert, wird die Hoch- bzw. Runterregulation anderer Gene durch die verschiedenen Mutationen, die dann wiederum die unterschiedlichen KM zur Folge haben. Die genetische Analyse würde erhebliche prognostische Vorteile bieten, vor allem zur Identifikation von Hochrisikopatienten und bisher asymptomatischen Familienmitgliedern [Keren 2008, McKenna 2012].

Klinischer Verlauf und Diagnostik der HCM Die klinische Präsentation und der zeitliche Verlauf einer HCM sind sehr variabel. Typische Symptome sind Herzinsuffizienzzeichen, synkopale und präsynkopale Episoden, sowie Palpitationen und Angina pectoris (AP), ähnlich einem akuten Myokardinfarkt [Maron 2008/2, Semsarian 2007]. Neben einer ausführlichen Anamnese und körperlichen Untersuchung, gehören zur Diagnostik ein 12-

Kanal Elektrokardiogramm (EKG) und ein Echokardiogramm. Definitionsgemäß liegt eine Hypertrophie ab einer LV-Wanddicke von ≥ 13 mm vor [Elliot 2012, Semsarian 2007]. Ziel zukünftiger Diagnostik ist die umfangreiche genetische Untersuchung. Leider ist dies derzeit aufgrund finanzieller und logistischer Probleme nicht möglich [Keren 2008].

Während einige Betroffene keinerlei Einschränkung der Lebensqualität und -erwartung erfahren, führt die Erkrankung bei anderen sogar zum Tod. Häufige Auswirkung sind Herzinsuffizienz, Arrhythmien und thromboembolische Komplikationen. Die Mortalitätsrate liegt bei 1 %, bei Kindern und HOCM-Patienten bei 2 % [Maron 2008/2, Roberts 2005]. Hauptverantwortlich dafür sind folgende Ursachen: plötzlicher Herztod, ausgelöst durch ventrikuläre Arrhythmien; Herzinsuffizienz aufgrund stetigen Vorhofflimmerns und Schlaganfall infolge von paroxysmale oder permanentem Vorhofflimmern [Hagège 2009]. In 5-10 % findet ein *remodeling* der LV-Herzmuskulatur, mit daraus resultierender Dilatation, Verschmälerung der Ventrikelwand und systolischer Dysfunktion, das Endstadium der HCM, statt [Keren 2008, McKenna 2012]. HCM ist zudem die häufigste Ursache eines plötzlichen Herztods bei jungen Menschen bis zum 35. Lebensjahr. Bei 75 % der Betroffenen ist der plötzliche Herztod die erste klinische Erscheinungsform [Hagège 2009, Semsarian 2007]. Risikofaktoren sind eine positive Familienanamnese, eine LV-Hypertrophie (> 30 mm), paroxysmale ventrikuläre Tachykardien (> 120 Schläge/min), unbegründbare Synkopen oder Präsynkopen und ein inadäquater Blutdruckanstieg bei Bewegung (≤ 25 mmHg). Betroffenen wird ein implantierbarer Kardioverter-Defibrillator (ICD) empfohlen [Hagège 2009, Maron 2008/2]. Therapeutisch stehen die medikamentöse Therapie der Herzinsuffizienz und der Ausflusstraktobstruktion im Vordergrund. Bei unzureichender medikamentöser Therapie, stehen invasive Behandlungsmöglichkeiten, z.B. die Implantation eines Herzschrittmachers, die transkoronare Alkoholablation des hypertrophen Septums oder die gezielte Myektomie, zur Verfügung. Ultima Ratio ist die Herztransplantation. Die Hoffnung liegt jedoch auf einer zukünftigen Gentherapie und einer umfassenderen genetischen Diagnostik [Hagège 2009].

1.1.3 Linksventrikuläre *Non-Compaction* Kardiomyopathie

Definition, Charakteristika und Klassifikation Die LVNC wurde erstmals 1984 durch Engberding und Bender beschrieben [Engberding 1984]. Charakteristische Merkmale sind ein "schwammartiges" Myokard und eine prominente Trabekularisierung des linken Ventrikels. Die Trabekel sind von tiefen intertrabekulären Recessus durchzogen, welche mit der

Ventrikelhöhle, aber nicht mit den Koronararterien, in Verbindung stehen [Connolly 2011, Wienecke 2005]. Sie verleihen dem Myokard die typische, differentialdiagnostisch wichtige, zweischichtige Optik, bestehend aus einer kompaktierten epikardialen- und einer nicht-kompaktierten endokardialen Schicht. Die häufigsten Lokalisationen der Hypertrabekularisierung sind der Apex und die mittlere laterale Wand des linken Ventrikels. Das Myokard neigt zudem zu hypokinetischen Wandbewegungsstörungen [Jenni 2001, Petersen 2005, Sarma 2010]. Je nach Definition und Präzision der Diagnostik liegt die Prävalenz der LVNC bei 0,014 % [Connolly 2011, Oechslin 2000] bis 15,8 % [Belanger 2008]. Aufgrund fehlender diagnostischer Richtlinien und mangelnder Kenntnis gilt die LVNC als unterdiagnostizierte Erkrankung [Stöllberger 2002]. Teilweise wird der Begriff Linksventrikuläre Hypertrabekularisierung bevorzugt, weil *Non-Compaction* suggeriert, dass der genaue Pathomechanismus bekannt ist [Finsterer 2009, Stöllberger 2002]. Abbildung 1.3 zeigt die typischen Merkmale.

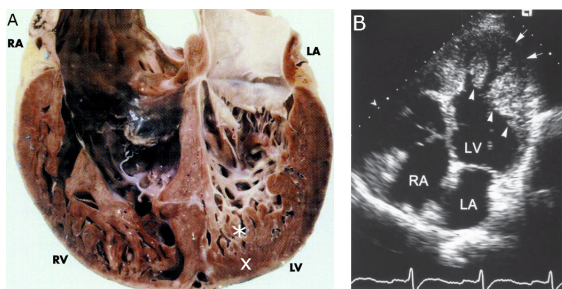


Abbildung 1.3: (A) Humanes Sektionspräparat eines Herzens mit LVNC. Kompaktierte epikardiale (x) und nicht-kompaktierte endokardiale Schicht (*). (B) Echokardiografischer Vierkammerblick. Dünne epikardiale Schicht (†) und ausgeprägte Trabekularisierung der endokardialen Schicht mit tiefen intratrabekulären Recessus (▶). LA=linkes Atrium; LV=linker Ventrikel; RA=rechtes Atrium; RV=rechter Ventrikel [Oechslin 2000].

Pathogenetische Erklärungsmodelle und genetische Ätiologie Zur Pathogenese der LVNC gibt es verschiedene Ansätze. Die *Non-Compaction*-Hypothese, die am häufigsten publizierte Theorie, beschreibt einen primären Pathomechanismus. Bei den betroffenen Patienten kommt es zum Ausbleiben der Kompaktierung in dem fetal kräftig trabekularisiertem Myokard [Captur 2010, Finsterer 2009]. Die Kompaktierung verläuft normal von der Basis zum Apex, vom Epi- zum Endokard und vom Septum zur lateralen Wand, was die bevorzugte Lokalisation der LVNC erklärt [Petersen 2005]. Die Kompensationshypothese, ebenfalls ein primärer Pathomechanismus, besagt, dass es durch einen primären genetischen Defekt zu funktionellen oder morphologischen Störungen des Myokards kommt. Die Hypertrabekularisierung stellt einen sekundären Anpassungsmechanismus auf diese Fehlentwicklung dar [Finsterer 2009]. Zu den Theorien der sekundären Pathomechanismen gehören

die hämodynamisch-ischämische - und die Myokarditis Hypothese, in welchen die Hypertrabekularisierung auch als Anpassungsreaktion an das geschädigte Myokard gesehen wird [Finsterer 2009].

Über einen möglichen genetischen Ursprung der Erkrankung lässt sich bisher aufgrund der geringen Fallzahl und uneinheitlichen diagnostischen Richtlinien keine eindeutige Aussage treffen. Jedoch wird davon ausgegangen, dass mindestens 50 % genetischen Ursprungs sind [Captur 2010]. Wie bei anderen KM scheint die Genetik der LVNC sehr heterogen zu sein. Es wurden bisher sowohl autosomal-dominante, autosomal-rezessive sowie X-chromosomale Erbgänge beschrieben [Bleyl 1997, Finsterer 2009, Klaassen 2008, Wienecke 2005]. Die sinnvollste Einteilung scheint die Differenzierung zwischen isolierter LVNC und LVNC gekoppelt mit anderen genetischen Erkrankungen. Zu den bisher gefundenen genetischen Ursachen einer isolierten LVNC gehören z.B. LMNA-Mutationen. In einer Familie, in der der Vater und ein Sohn an einer DCM litten, zeigte ein weiterer Sohn eine isolierte LVNC. Alle trugen die LMNA-Mutation R190W [Hermida-Prieto 2004]. 2008 veröffentlichten Klaassen et al eine Studie in der 63 Patienten mit isolierter LVNC auf Sarkomer Mutationen untersucht wurden. Elf Patienten wiesen eine Mutation auf. Darunter waren sieben MYH7-, eine ACTC- und eine TNNT2-Mutation [Klaassen 2008]. Insgesamt konnte bisher für neun verschiedene Gene eine Assoziation zur isolierten LVNC nachgewiesen werden: LBD3 (LIM bindende Domäne 3), DTNA (α -Dystrobrevin), TAZ (Tafazzin), LMNA (Lamin A/C), MYH7 (β -Myosin schwere Kette), ACTC (α -Kardiales Aktin), TNNT2 (Kardiales Troponin T), SCN5A (Protein des Natriumkanals), TPM1 (Tropomyosin 1). LVNC tritt häufig zusammen mit anderen genetischen Erkrankungen auf, welche Ausdruck der großen genetischen Heterogenität sind. Zu den häufigsten zählen neuromuskuläre Erkrankungen, wie das Barth-Syndrom [Bleyl 1997], mitochondriale Erkrankungen [Finsterer 2009] und andere KM, wie der Fall eines 26-jährigen Mannes der echokardiographische Merkmale einer HCM und einer LVNC zeigte [Kelley-Hedgepeth 2009]. Pauli et al veröffentlichten den Fall eines 7 1/2-jährigen Mädchens mit LVNC in Kombination mit einem Vorhofseptumdefekt und einer DCM [Pauli 1999]. Zur Aufklärung der Pathogenese ist eine gründliche Diagnostik einschließlich genetischer Untersuchung aller Patienten und der Verwandten ersten Grades wichtig.

Klinische Präsentation und Diagnostik der LVNC Der Verlauf ist sehr variabel. Der Zeitpunkt der Diagnose reicht von pränatal bis ins hohe Alter und die Symptomspanne erstreckt sich von Symptombefreiheit bis hin zu Dyspnoe, AP, Palpitationen und Synko-

pe [Captur 2010]. Die Mehrzahl der Patienten leiden an schwerwiegenden Folgen, vor allem Herzinsuffizienz. In einer Studie mit 34 NC-Patienten zeigten 65 % eine Herzinsuffizienz NYHA I/ II und in 35 % sogar NYHA III/ IV [Oechslin 2000]. Durch ventrikuläre Arrhythmien und Thrombenbildung in den Recessus kann es zu zerebralen und pulmonalen Embolien kommen. In diesem Fall wird eine Dauertherapie mit oralen Antikoagulantien notwendig. Des Weiteren können tödliche ventrikuläre Arrhythmien auftreten [Captur 2010, Sarma 2010]. Asymptomatischen Patienten wird keine Therapie, jedoch eine regelmäßige Kontrolle empfohlen. Ist eine Herzinsuffizienz vorhanden, erfolgt die stadiengerechte Therapie entsprechend den Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie. Eine therapierefraktäre Herzinsuffizienz NYHA III/ IV ($EF < 35 \%$) oder permanente Arrhythmien, erfordern die Implantation eines ICD. Ultima ratio ist die Herztransplantation [Sarma 2010]. Bis heute gibt es keine einheitlichen diagnostischen Richtlinien. Die ersten Kriterien von Chin et al besagen eine enddiastolische echokardiographische Messung des Abstandes zwischen Epikard und dem tiefsten Punkt des intertrabekulären Recessus (X) und des Abstandes zwischen Epikard und Trabekelspitze (Y) im apikalen Vierkammerblick. Eine Ratio $X/Y \leq 0.5$ gilt als signifikant für eine LVNC [Captur 2010, Chin 1990]. Zur Rekrutierung der NC-Patienten in der vorliegenden Arbeit, wurden die Kriterien von Jenni et al verwendet. Während der Endsystole werden echokardiographisch die Durchmesser der nicht-kompaktierten endokardialen (NC) und der kompaktierten epikardialen Schicht (C), an der Stelle der stärksten LV Wandverdickung, gemessen. Eine LVNC besteht ab einer Ratio $NC/C > 2$ bei Erwachsenen und $> 1,4$ bei Kindern [Captur 2010, Jenni 2001]. Abbildung 1.4 stellt beide Kriterien gegenüber. Des Weiteren gibt es Definitionen anhand gemessener Werte im kardialen *Magnetic Resonance Imaging* [Petersen 2005] oder der Anzahl signifikanter Trabekel [Stöllberger 2002].

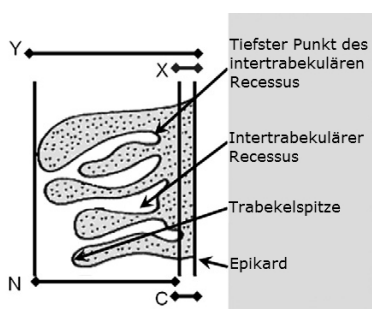


Abbildung 1.4: Diagnostik der LVNC. Chin et al: Verhältnis zwischen dem Abstand des Epikards zum tiefsten Punkt des Recusses (X) und dem Abstand des Epikards zur Trabekelspitze (Y). Jenni et al: Verhältnis zwischen der Dicke der nicht-kompaktierten (N) und kompaktierten Schicht (C). Modifiziert nach [Captur 2010]

1.1.4 Familiäre dilatative Kardiomyopathie und deren genetische Ursachen

Die DCM ist mit 60 % die häufigste Kardiomyopathie weltweit [Malhotra 2009]. Ihre Prävalenz beträgt 1:2500 [Jefferies 2010]. Charakteristisch ist die Dilatation und die daraus folgende systolische Dysfunktion des linken Ventrikels, aufgrund dessen die Patienten an Arrhythmien und zunehmender Herzinsuffizienz leiden. Sie besitzen ein hohes Risiko für einen plötzlichen Herztod und thromboembolische Komplikationen. Durch ihren progressiven Verlauf hat die DCM eine sehr hohe Morbidität und Mortalität. Die Therapie besteht aus rein symptomatischen Behandlungskonzepten unabhängig von der Ätiologie [Jefferies 2010, Malhotra 2009, Richardson 1996]. Die vielfältigen Ursachen werden in primäre und sekundäre, wie Drogen, Medikamente und Schwangerschaft eingeteilt. Primäre Ursachen sind genetische, gemischte und erworbene, z.B. Myokarditis. Fortschritte der genetischen Screeningmethoden ließen den Anteil der familiären DCM (fDCM) je nach Studie von 1 % auf 20-50 % der ideopathischen DCM Fälle steigen. Die Vererbung ist überwiegend autosomal-dominant [Hershberger 2009, Jefferies 2010, Taylor 2006]. In Analogie zu den anderen KM ist die fDCM trotz des charakteristischen Phänotyps sehr heterogen. Bisher wurden über 40 Gene mit zahlreichen unterschiedlichen Mutationen identifiziert. Die Mehrzahl der Gene lässt sich bestimmten Zellkompartimenten zuordnen (Abb. 1.5) [Dellefave 2010]. Ähnlich wie bei HCM spielen Mutationen in Genen verschiedener Sarkomerproteine eine wichtige Rolle. Sie sind für 25 % der iDCM und 10 % der fDCM verantwortlich. Charakteristisch ist die starke intra- und interfamiliäre Variabilität des Verlaufs und der Penetranz [Dellefave 2010]. LMNA ist mit einer Prävalenz von 5-8 % der fDCM [Dellefave 2010] und bis 30 % der iDCM [Saga 2009] eines der häufigsten fDCM-Krankheitsgene. Während die Penetranz bis zum 20. Lebensjahr 7 % beträgt, steigt sie bis zum 60. Lebensjahr auf 100 % [Dellefave 2010].

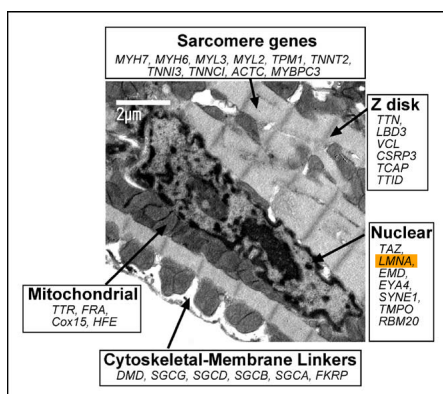


Abbildung 1.5: Elektronenmikroskopisches Bild eines Kardiomyozyten mit den verschiedenen Kompartimenten der fDCM-Krankheitsgene [Dellefave 2010]. LMNA ist als eines der wichtigsten farbig hervorgehoben.

Merkmal der LMNA-assoziierten fDCM ist das Vorhandensein verschiedener Herzrhythmusstörungen (HRST). Eine DCM in Verbindung mit einem AV-Block ist am häufigsten durch LMNA-Mutationen bedingt [Jefferies 2010]. Ob LMNA auch in der Pathogenese der HCM und der LVNC eine Rolle spielt, ist Gegenstand dieser Arbeit.

1.2 Lamin A/C als Teil der Laminfamilie

1.2.1 Systematisierung und Lokalisation der Lamine

Die Lamine sind wichtige Strukturproteine des Kerns und der Kernhülle, welche aus der inneren und äußeren Kernmembran (INM und ONM), dem Kernporenkomplex (NPC) und der Kernlamina besteht. Die Kernlamina, ein dichtes, gut organisiertes, detergenten- und salzresistentes Netzwerk unter der nuklearplasmatischen Seite der INM, verleiht dem Kern seine Form und mechanische Stabilität [Broers 2006, Stuurman 1998]. Hauptbestandteil sind die Lamine [Stewart 2007/1]. Abbildung 1.6 zeigt die Kernhülle und deren Bestandteile.

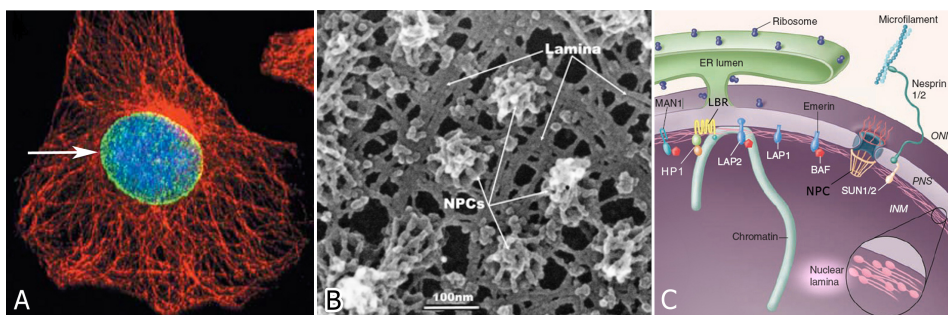


Abbildung 1.6: (A) Immunfluoreszenz-Aufnahme einer Zelle einer Rattenniere. Der Pfeil kennzeichnet die Kernhülle[Burke 2002]. (B) Elektronenmikroskopische Abbildung der Kernlamina und des Kernporenkomplex (NPC)[Broers 2006]. (C) Schematische Übersicht der Organisation der Kernhülle [Stewart 2007/1].

Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit gelten Lamine als Intermediärfilamente (IF) Typ V [Aebi 1986]. Es gibt drei verschiedene Lamingene, LMNA, LMNB1 und LMNB2, die für sieben unterschiedliche Proteine kodieren. Alle entstehen durch alternatives Spleißen. Die Proteine lassen sich in zwei Gruppen, A- und B-Typ Lamine, unterteilen [Stuurman 1998]. Der Schwerpunkt der Laminvorstellung liegt auf den untersuchten A-Typ Laminen, Lamin A und C. Diese werden in allen differenzierten Zellen exprimiert und bilden die Hauptprodukte des Gens LMNA. Des Weiteren kodiert es für das keimzellspezifische Lamin C₂ und Lamin A Δ 10. LMNA liegt auf dem langen Arm von Chromosom eins an Position 1q21.1-21.3. [Broers 2006, UniProt 2011]. A-Typ Lamine sind nicht nur Teil der Kernlamina, sondern bilden zusätzlich ein diffus verzweigtes Netzwerk vom Nucleolus bis zur Zellkernperipherie.

Es besteht aus dünneren Filamenten und dichteren Laminfoci, die mit Chromatin assoziiert sind [Hozák 1996, Moir 2000, Burke 2002].

1.2.2 Genetischer Aufbau und Proteinstruktur von Lamin A/C

Wie alle IF besitzen Lamine eine typische dreigeteilte Struktur. Das variable non-helikale NH₂-terminale Ende bildet den Kopf, die *head-domain*, der Proteine und umrandet zusammen mit dem non-helikalen Schwanz, der *tail-domain*, die α -helikale *rod-domain*. Die stärkste evolutionäre Konservierung befindet sich jeweils am Übergang der α -helikalen *rod-domain* zu den non-helikalen Abschnitten, was die Relevanz dieser IF-Regionen für die Bildung höhere Strukturen verdeutlicht [Parry 1986, Stuurman 1998].

LMNA besitzt zwölf kodierende Exons. Die Isoform Lamin A umfasst 664 Aminosäuren (AS) (70kDa), während Lamin C (65 kDa) die AS 573 bis 664 fehlen. Die *head-domain* (AS 1- 33) ist viel kürzer als die anderer IF und besitzt eine hoch positive Ladung, welche zusammen mit dem positiv geladenen COOH-terminalen Ende der *rod-domain*, wichtig für die Protein-Protein-Interaktion ist. Die α -helikale *rod-domain* (AS 34-383) beinhaltet vier *coiled-coil* Regionen: 1A (34-70), 1B (81-218), 2A (243-296) und 2B (306-383), die durch spezielle, evolutionär hoch konservierte Linker-Regionen voneinander getrennt werden: L1 (71-80), L12 (219-242) und L2 (297-305). Die Region 1A-L12 ist in die Interaktionen mit Lamin B und Lamin A/C involviert. Die COOH-terminale *tail-domain* (AS 384-664) ist die variabelste Region der Lamine und enthält die meisten Bindungsstellen für laminbindende Proteine. Innerhalb der *tail-domain* liegt die *Immunoglobulin-like domain* (*Ig-like domain*), die Einfluss auf die Interaktion mit anderen Proteinen, wie LAP2 α und Emerin, hat. Zwischen der *Ig-like domain* und dem COOH-terminalen Ende der *rod-domain* liegt ein Kernlokalisierungssignal (AS 417-422). Kein anderes IF besitzt diese Sequenz, welche unabdingbar für die Lokalisation innerhalb des Kerns und die Chromatinbindung ist [Broers 2006, Perrot 2009, UniProt 2011]. Ebenfalls einmalig ist die CaaX-Box am Ende der *tail-domain*, bestehend aus einem Cysteinrest, zwei aliphatischen AS und einer beliebigen anderen AS [Stuurman 1998]. Die posttranslationale Modifikation der CaaX-Box des entstandenen Prälamins A hat entscheidenden Einfluss auf die spätere Lokalisation, Löslichkeit während der Mitose und Funktion des Proteins [Broers 2006, Dechat 2008]. Mutationen innerhalb der CaaX-Box können zur Akkumulation von Prälamins A im Kernplasma führen [Holtz 1989, Lutz 1992]. Abbildung 1.7 zeigt den Aufbau des LMNA-Gens und die Proteinstruktur von Lamin A/C.

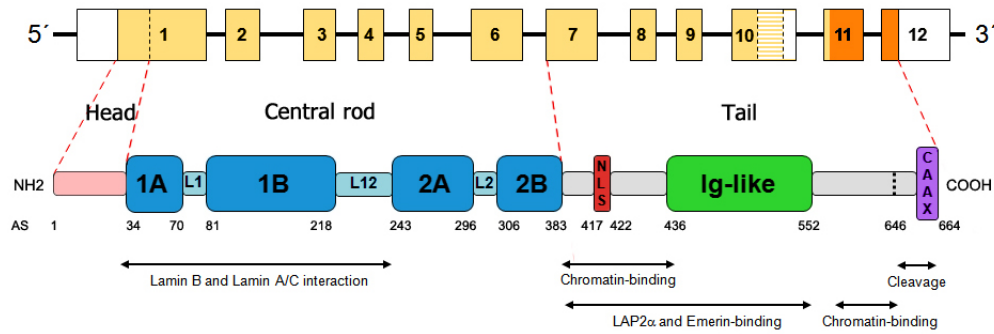


Abbildung 1.7: Gen- und Proteinstruktur von Lamin A/C einschließlich der einzelnen Proteindomänen. Modifiziert nach [Perrot 2009].

Wichtig für die spezifische Funktion der Lamine ist die korrekte, bisher nicht genau bekannte Tertiärstruktur. Abbildung 1.8 zeigt die verschiedenen Stufen der Laminorganisation. Anfangs lagern sich zwei Laminmoleküle lateral parallel aneinander und bilden ein 50 nm langes Lamindimer, ähnlich einem Myosinmolekül. Die *rod-domains* bilden ein *coiled-coil*, während die *head-* und *tail-domains* ungewunden bleiben. Anschließend entstehen *head-to-tail* Polymere durch longitudinale Aneinanderlagerung der Lamindimere [Aebi 1986, Isobe 2007, Stuurman 1998]. Aufgrund ionischer Wechselwirkung lagern sich die *head-to-tail* Polymere lateral, halb versetzt und vermutlich antiparallel aneinander. Im Unterschied zu den IF I-IV bilden Lamine *in vitro* keine Filamente, sondern parakristalline Strukturen [Parry 1986, Stuurman 1998]. Versuche mit *Xenopus* Lamin A und *Drosophila* Lamin C konnten zeigen, dass A-Typ Lamine auch *in vivo* eine parakristalline Form annehmen [Klapper 1997].

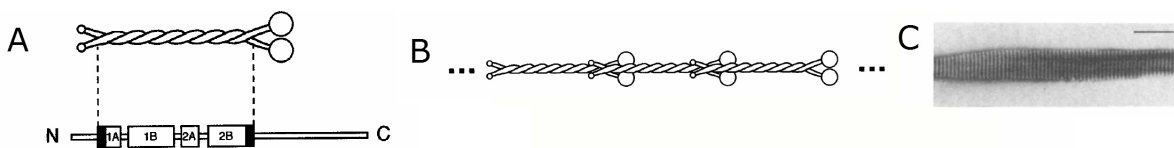


Abbildung 1.8: Stufen der Laminorganisation. (A) Lamindimer. (B) *head-to-tail* Polymere [Stuurman 1998]. (C) Parakristalline Struktur aus Zellen einer Rattenleber (*in vitro*) [Aebi 1986].

1.2.3 Lamin A/C - Funktion und -Interaktion mit anderen Proteinen

Die Proteine Lamin A/C haben zahlreiche Funktionen und Interaktionen. Als Teil der Kernlamina sind Lamin A/C besonders wichtig für die Stabilität des Zellkerns und für die Verankerung von Transmembranproteinen der Kernhülle [Broers 2006]. Durch Wechselwirkungen mit Nesprin 1/2, einem Linkerprotein des Zytoskeletts, das mit Aktin interagiert und Verbindungen zu NUP153, einem Protein des NPC, haben Lamin A/C zusätzlich Einfluss auf

die Gesamtstruktur des Zytoskeletts [Broers 2006, Nikolowa 2004].

Wichtige Funktionen des intranukleären Lamin A/C ist der Einfluss auf die Zellproliferation und -differenzierung durch die Modulation verschiedener Transkriptionsfaktoren (TF) z.B. das Retinoblastom-Protein (Rb), einem wichtigen Tumorsuppressor und Zellzyklusregulator. Zellkulturstudien zeigen die Assoziation von intranukleärem Lamin und hypophosphoryliertem Rb in speziellen Herden im Kernplasma. Der Verlust von Lamin A/C führt zum signifikanten Abfall der Rb-Konzentration und zur Umverteilung des restlichen Rbs [Johnson 2004, Kennedy 2000]. Weiterhin führt die LMNA-Mutation R453W, eine der häufigsten Mutationen bei autosomal-dominanter Emery Dreifuß Muskeldystrophie (EDMD), in C2C12 Myoblasten zur erheblichen Reduktion oder zum Ausbleiben der Differenzierung [Favreau 2004, Markiewicz 2005]. Ob sich ein Lamin A/C-Defizit auf den Gesamtgehalt oder ausschließlich auf den Phosphorylierungszustand von Rb auswirkt und inwiefern die Interaktion direkt und/oder indirekt über LAP2 α ist, gilt es herauszufinden [Johnson 2004]. Durch die Interaktion mit dem TF *sterol response element binding protein 1* (SREBP1) hat Lamin A/C Einfluss auf die Entwicklung des Fettgewebes. Mäuseadipozyten mit einer LMNA-Mutation, die häufig bei Familiärer partieller Lipodystrophie (FPLD) auftritt, zeigen eine Minderung der SREBP1-Lamin A/C-Interaktion [Lloyd 2002]. Des Weiteren soll Lamin A/C mit den TF c-Fos und MOK2 in Verbindung stehen [Broers 2006].

Verschiedene Studien zeigen eine Beeinflussung der DNA-Replikation. Beispielsweise findet die Initiation der DNA-Replikationen in Säugetierzellen in mehreren kleinen Herden im Kernplasma statt, welche sowohl mit Lamin A/C als auch mit Rb assoziiert sind [Kennedy 2000]. Weiterhin ist die Phosphorylierung von Lamine A/C ein essentieller Schritt für die Dissoziation der Kernhülle während der Initiation der Mitose [Burke 2002, Isobe 2007, Peter 1990]. Intranukleäre A-Typ Laminherde sind ferner an der Transkription durch Organisation von Spleißfaktoren und der RNA-Polymerase II beteiligt. Störungen dieses Zusammenspiels führen zur Hemmung der Transkription [Kumaran 2002]. Über eine spezielle Sequenz innerhalb der *tail-domain* können Lamin A/C an Histone binden und stehen mit Chromatin in Verbindung. Inwiefern diese indirekte DNA-Bindung Effekte auf die Replikation, Transkription oder andere Zellvorgänge hat, ist bisher nicht eindeutig geklärt [Mattout 2007, Stuurman 1998]. Die Apoptose scheint durch Lamin A/C ebenfalls maßgeblich beeinflusst zu werden. Ein wichtiger Schritt der Initiation ist die Spaltung von Lamin A/C in der Linkerregion L12 durch Caspase 6 [Broers 2006]. Abbildung 1.9 gibt eine Übersicht über die komplexe Interaktion

von Lamin A/C, deren Relevanz durch das große Spektrum der Laminopathien unterstrichen wird. Es verdeutlicht zudem die Wichtigkeit neben den Laminen auch die Funktion der laminbindenden Proteine aufzuklären, um das komplexe Zusammenspiel dieser zu verstehen und Aufschluss über eventuelle Pathomechanismen zu geben [Broers 2006, Van Berlo 2005].

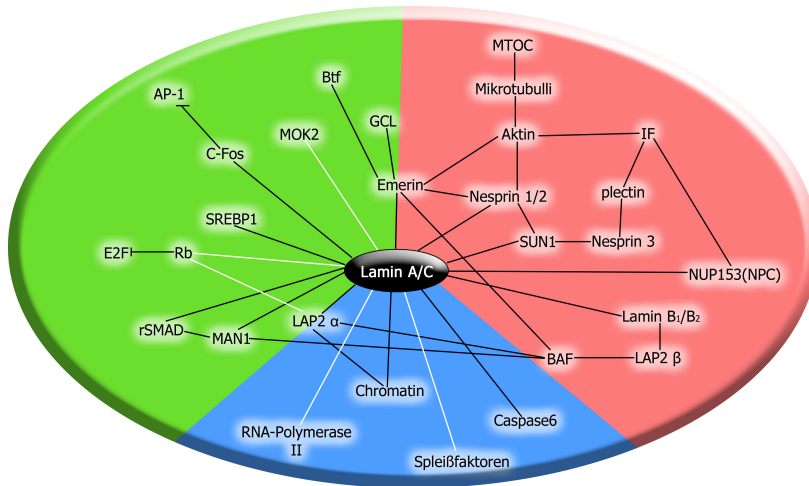


Abbildung 1.9: Übersicht der komplexen Interaktion von Lamin A/C. Grün - Einfluss auf die Zelldifferenzierung durch Interaktion mit verschiedenen TF. Rot - Beeinflussung der Funktion und Stabilität der Kernhülle und des Zytoskeletts. Blau - Einflussnahme auf verschiedene Zellvorgänge. Schwarz - direkte Interaktion. Weiß - indirekte oder unklare Interaktionen. | = Hemmung. [Broers 2006, Johnson 2004, Van Berlo 2005].

1.2.4 Genotyp-Phänotyp-Korrelation und pathogenetische Erklärungsmodelle

Aufgrund der pleiotropen Eigenschaften des LMNA-Gens können bisher keine zuverlässigen Aussagen über eine Genotyp-Phänotyp Korrelation getroffen werden. Dies trifft vor allem für die Erkrankungen des quergestreiften Muskels zu, deren Mutationen sich über das gesamte Gen verteilen [Broers 2006]. Besonders interessant ist die Tatsache, dass eine Mutation innerhalb einer Familie ganz unterschiedliche Phänotypen hervorrufen kann. Beobachtet wurde eine variable Kombination aus DCM, HRST, EDMD und Limb Girdle Muskeldystrophie (LGMD) [Brodsky 2000]. Anders verhält es sich für einige Erkrankungen aus Gruppe drei und vier (Abb. 1.10), wie FPLD, welche meistens durch Mutationen im Kodon 482 hervorgerufen wird und das Hutchinson Gilford Progerie Syndrom (HGPS), das überwiegend durch die LMNA-Mutation G608G verursacht wird [Merideth 2008, UMD 2010].

Zur Entstehung der Laminopathien gibt es verschiedene Hypothesen, die hier nicht alle im Einzelnen besprochen werden sollen. Es scheint jedoch, dass den einzelnen Gruppen verschiedene Pathomechanismen zugrunde liegen. Bei dem Laminopathien des quergestreiften Muskels wird zum einen vermutet, dass LMNA-Mutation zur Störung der Rb-Expression

und/oder des Rb-Phosphorylierungszustandes führen und dadurch die Differenzierung und Proliferation gehemmt wird [Favreau 2004, Markiewicz 2005]. Zum anderen sollen strukturelle Veränderungen des Laminnetzwerkes zu Störungen der funktionellen und strukturellen Integrität des Zellkerns und der Zelle führen [Nikolowa 2004, Stewart 2007/1, Sullivan 1999]. Mäusefibroblasten ohne LMNA zeigen weiterhin eine deutliche Schwächung der Kernhülle und eine Beeinträchtigung des Stress-induzierten NF κ B-Signalweges mit Anfälligkeit gegenüber mechanischem Stress [Broers 2006]. Für das HGPS wird von einer Prälamina A-Toxizität ausgegangen. Durch die Mutation p.G608G entsteht ein gekürztes farnesyliertes Prälamina A, Progerin, welches toxische Effekte auf die Zellstruktur und -funktion haben soll. Nicht-farnesyliertes Prälamina A führte in *knock-in* Mäusen hingegen zur DCM [Davies 2010].

1.2.5 Laminopathien

Laminopathien sind eine sehr heterogene Gruppe von Erkrankungen, die durch Mutationen im LMNA-Gen hervorgerufen werden. Die unterschiedlichen Phänotypen sind teilweise auf die Expression von LMNA in verschiedenen Geweben, wie Muskel- und Fettgewebe, zurückzuführen, doch lässt es zudem das Funktionsspektrum von Lamin A/C und der laminassoziierten Proteine erahnen [Stewart 2007/1]. Bis heute sind über 408 verschiedene Mutationen und über 266 Proteinvarianten des Lamin A/C-Gens bekannt [UMD 2010]. Die Laminopathien lassen sich in vier Gruppen (Abb. 1.10) einteilen, obgleich es auch Überlappungen gibt. Gruppe eins bis drei werden aufgrund der Pathologie eines bestimmten Gewebes als Spezifische Laminopathien, Gruppe vier hingegen als Systemische Laminopathien, bezeichnet [Worman 2007]. Von besonderem Interesse für dieses Projekt ist die rot markierte autosomal-dominante DCM, die bisher die einzige laminassoziierte Erkrankung des Herzmuskels ist.

1. Erkrankung des quergestreiften Muskels	2. Periphere Neuropathie
<ul style="list-style-type: none"> -Autosomal-dominante EDMD -Autosomal-rezessive EDMD -Autosomal-dominante DCM 1A -Autosomal-dominante Muskeldystrophie vom Gliedergürtel-Typ 1B (LGMD) 	<ul style="list-style-type: none"> -Autosomal-rezessive Marie-Charcot-Tooth Neuropathie Typ 2B1
LAMINOPATHIEN	
<ul style="list-style-type: none"> -Autosomal-dominante Familiäre partielle Lipodystrophie vom Typ Dunnigan (FPLD) -Autosomal-dominante Lipoatrophie in Kombination mit Diabetes mellitus, Lebersteatose, HCM und Leukomelanodermie -Autosomal-rezessive Manidulo-akrale Dysplasie (MAD) 	<ul style="list-style-type: none"> -Autosomal-dominantes atypisches Werner Syndrom -Autosomal-dominantes Hutchinson-Gilford-Progerie-Syndrom -Autosomal-dominante letale Restriktive Dermopathie
3. Erkrankungen des Fettgewebes	4. Erkrankungen des vorzeitigen Alterns

Abbildung 1.10: Klassifikation der Laminopathien [Worman 2007].

2 Zielsetzung

Der Formenkreis der Kardiomyopathien umfasst eine komplexe Gruppe von Erkrankungen des Herzmuskels unterschiedlicher Genese. Die HCM und die LVNC gehören laut Klassifikation der AHA beide zur Gruppe der genetisch bedingten Kardiomyopathien. Mit einer Prävalenz von 1:500 ist die HCM die häufigste genetisch bedingte kardiovaskuläre Erkrankung und die häufigste Ursache für einen plötzlichen Herztod unter 35 Jahren. Bisher sind über 20 verschiedene Krankheitsgene bekannt, wobei circa 70 % durch Mutationen in den Sarkomerproteinen β -MHC und MBP-C ausgelöst werden. Die Pathogenese der LVNC ist weit weniger erforscht doch wird von einer genetischen Ursache in mehr als 50 % ausgegangen.

Die Proteine Lamin A und C sind wichtige Bestandteile der Kernhülle. Sie bilden zusammen mit anderen Proteinen die Kernlamina, welche sich als dichtes Netzwerk unter der INM ausbreitet. Durch die Modulation verschiedener TF wie Rb oder SREBP1 nehmen sie Einfluss auf die Zellproliferation und -differenzierung. LMNA zählt zu den häufigsten Krankheitsgenen einer fDCM. Da es auch andere Krankheitsgene mit pleiotropen Effekten bezüglich des CM-Phänotyps gibt, beschäftigt sich die vorliegende Arbeit mit der Frage: "Gibt es genetische Varianten im Lamin A/C-Gen bei Patienten mit HCM oder LVNC?". Zur Beantwortung dieser Frage sollen alle zwölf codierenden Exon des Lamin A/C-Gens in verschiedenen Patientenkollektiven amplifiziert werden. Die genetische Analyse erfolgt durch anschließende Sequenzierung und Auswertung der DNA-Sequenzen mit Hilfe des Computerprogramms SEQUENCHER 4.1. Als DNA-Referenz wird das Transkript LMNA-001 (ENST00000368300) der genomischen Datenbank *ensemble* verwendet. Werden Varianten identifiziert, soll weiterhin geklärt werden, ob es sich bei diesen um eine Mutation oder einen *Single Nucleotide Polymorphism* (SNP) handelt und ob die gefundene Variante relevant für die Krankheitsentstehung ist. Aus diesem Grund muss für jede nicht-synonyme Variante eine Kontrollgruppe von 300 gesunden Probanden auf die Variante hin untersucht werden. Synonyme Varianten hingegen werden mit Hilfe des Computerprogramms RESCUE-ESE auf die Veränderung möglicher *splice sites* untersucht. Die Analyse der Kontrollgruppe wird anhand eines Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (RFLP) geschehen. Kann eine Mutation bestätigt werden, sollen wenn möglich Familienangehörige analysiert werden, um eine Aussage über die Vererbungsmodi und etwaige Ursachen-Wirkungsbeziehung zwischen Mutation und KM machen zu können.

3 Material und Methoden

3.1 Chemikalien

Tabelle 1: Übersicht aller verwendeten Chemikalien.

Chemikalie	Zusatzinformation	Hersteller
ABI PRISM® Big Dye® Terminator v1.1	· fluoreszenzmarkierte ddNTPs · Puffer · dNTPs · Ampli Taq DNA- Polymerase	Applied Biosystems
ABI PRISM® Big Dye® Terminator v1.1, v3.1 5xSequencing Buffer		Applied Biosystems
Agarose		Biozym
5 M Betaine	6,76 g Betaine	Serva
Borsäure (H ₃ BO ₃)	M 61,83 g/mol	Roth
Bromphenolblau	0,25 %	Pierce
BsiHKA I	10,000 U/ml	New England BioLabs inc.
BSA		New England BioLabs inc.
dNTPs		Epicentre Biotechnologies
Ethidiumbromid		Roche
EDTA Dinatriumsalz Dihydrat		Roth
Exonuklease	20,0u/ml (aus <i>E. coli</i>)	BioLabs
Glycerol	30 %	Roth
Hae III	10,000 U/ml	New England BioLabs inc.
Hi-Di™ Formamide		Applied Biosystems
HPLC-Wasser		Roth
Master Amp™ Ampli Therm™ DNA-Polymerase	250u; 5 U/μl	Epicentre Biotechnologies
10x Master Amp™ PCR Enhancer	mit Betain	Epicentre Biotechnologies
10x Master Amp™ Ampli Therm™ PCR Puffer		Epicentre Biotechnologies
50 mM MgCl ₂	0,5 ml	Invitek
25 mM MgCl ₂ Solution		Epicentre Biotechnologies
Molekulargewichtsmarker	Typ VIII	MBI Fermentas
NEBuffer 2	50 mM NaCl 10 mM Tris-HCl 10 mM MgCl ₂ 1 mM DTT	New England BioLabs inc.
NEBuffer 3	100 mM NaCl 50 mM Tris-HCl 10 mM MgCl ₂ 1 mM DTT	New England BioLabs inc.

Primer (F+R)		BioTeZ
10x NH ₄ -Reaction Buffer	1,5 mn	Invitek
Sephadex TM G-50 Superfine		GE Healthcare
Shrimp Alkaline Phosphatase	1,0 u/µl	Promega
Taq DNA Polymerase	1000 units, 5 U/µl	Invitek
TRIS (C ₄ H ₁₁ NO ₃)	M 121,14 g/mol	Roth
Xylene Cyanol	0,25 %	Pierce

Anmerkung zum verwendeten Wasser: Für die PCR, die Sequenzierungen und die RFLP-Analyse wurde HPLC-Wasser der Firma Roth verwendet. Die Herstellung der Pufferlösungen, sowie Agarosegele, erfolgte mit Wasser der Membrapur-Wasseraufbereitungsanlage. Das Wasser wurde durch Ionenaustauschharze von Ionen befreit (Deionat) und verließ nach einer Membranfiltration die Anlage schwebstofffrei (0,2 µm Ausschlussgrenze).

3.2 Geräte

Tabelle 2: Geräteliste.

Gerät		Hersteller
ABI Prism 3100-Avant Genetic Analyzer		Applied Biosystem
Autopure 25 TM		Genra Systems
Digital Graphic Printer		Sony
DRI-Heizblock DB-2A		Techne
3700 (48-capillary) Genetic Analyzer		Applied Biosystem
E-Centrifuge		Lab4you
Eismaschine AF-100		Scotsman
Elektrophorese-Netzgerät PS 9009 TC		Gibco BRL Life Technologies
Elektronische 8-Kanalpipette; 0,2 - 10,0 µl		Biohit
Flachbettgelkammer		ABgene
Gelkammer Horizon® 58		Gibco BRL
8-Kanalpipetten:	0.5 - 10.0 µl	Abimed, Biozym
	2.0 - 20.0 µl	Rainin
	20.0 - 300.0 µl	Rainin
LaserJet 4000 N		Hewlett Packard
Magnetrührer RCT basic		IKA Labortechnik
Membrapur-Wasseranlage		Membrapur
Mikromat		AEG
Netzteil Biometra Power Pack P25		Biometra
Peltier Thermal Cycler; PTC-100 MJ TM Research		MJ-Research, Biozym
Peltier Thermal Cycler; PTC-200 MJ TM Research		MJ-Research, Biozym
Peltier Thermal Cycler; PTC-200 MJ TM Research Gradient		MJ-Research, Biozym
Pipetten:	0.1 - 10.0 µl	Abimed, Biohit, Eppendorf
	0.2 - 20.0 µl	

	10.0 - 100.0 μ l	
	20.0 - 200.0 μ l	
	100.0 - 1000.0 μ l	
Picufuge		Stratagene
Rotana 460R-Zentrifuge		Hettich
Standard Power Pack P25		Biometra
Thermocycler UNO		Biometra
The Butterfly TM Rotor		Roth

3.3 Sonstige Materialien

Tabelle 3: Sonstige verwendete Materialien.

Material	Hersteller
AB gene [®] PCR Plates	Thermo Scientific
DNA-Exitus Plus TM	AppliChem
Einführungshilfe für Sephadex	GE Healthcare
Erlenmeyerkolben	Carl Zeiss Jena
Handschuhe Latex Examination Gloves; S, M, L	Charité
Handschuhe Nitra Tex [®] ; S, M, L	Ansell
Handschuhe rotiprotectNitril; S, M, L	Roth
Kryoblock	Eppendorf
Messzylinder (50ml, 250ml)	Carl Zeiss Jena
MicroAmp TM	Applied Biosystem
MultiScreen [®] Assay System	Millipore
Parafilm	Pechiney Plastic Packaging
PCR 8er Deckelkette, gewölbt	Sarstedt
PCR Multiply [®] - μ Strip; 0,2 mL Kette	Sarstedt
Pipettenspitzen	Cotech
Reaktionsgefäße (2000 μ L, 1500 μ L, 600 μ L)	Biozym

3.4 Verwendete Computerprogramme

3.4.1 OLIGO 4.0

OLIGO 4.0 ist ein Computerprogramm zur manuellen Konstruktion von Primern. Zuerst wird eine Referenzsequenz des zu amplifizierenden Fragments in das Programm geladen. Anschließend werden über verschiedene Menüpunkte die Eigenschaften der Primer festgelegt.

3.4.2 SEQUENCHER 4.1

Mithilfe des Programms ist es möglich Elektropherogramme nach Abschluss der Sequenzierung auszuwerten. Dies geschieht stets im Vergleich zu einer Referenzsequenz. Weiterhin

können Varianten auf die Änderung möglicher Restriktionsschnittstellen untersucht werden.

3.4.3 RESCUE-ESE

RESCUE-ESE ist ein *online*-Arbeitsprogramm zur Überprüfung gefundener Varianten auf Veränderungen bestehender *splice sites*. Die zu untersuchende Sequenz wird als Wildtyp in das Programm geladen. Danach werden alle Kodons, die für das *splicing* von Bedeutung sind, gelb gekennzeichnet. Sollte die gefundene Variante innerhalb eines markierten Kodons liegen, kann durch Wiederholung des Vorgangs mit dem veränderten Nukleotid eine mögliche Änderung der *splice site* identifiziert werden. (<http://genes.mit.edu/burgelab/rescue-ese/>)

3.5 Patientenkollektive

In der vorliegenden Arbeit wurden drei verschiedene Patientenkollektive untersucht, zwei HCM-Kollektive und ein NC-Kollektiv. Die Diagnostik der HCM-Patienten beinhaltete eine körperliche Untersuchung, ein EKG, eine transthorakale Echokardiographie und eine Herzkatheterisierung. Zusätzlich wurden mit diesen Methoden myokardiale Veränderung, wie Hypertonie, Herzklappenerkrankungen, angeborene Herzfehler sowie Koronarsklerose als Ursache der Hypertrophie ausgeschlossen. Definitionsgemäß besteht eine Hypertrophie ab einer LV-Wanddicke von $\geq 13\text{mm}$. Das erste HCM-Kollektiv (K1) besteht aus 72 Patienten. Vor der Analyse des LMNA-Gens wurden alle Patienten auf Mutationen in den bisher bekannten HCM-Genen (siehe Tabelle 29 im Anhang) untersucht. Diese erwiesen sich als negativ. Das zweite HCM-Kollektiv (K2) bestand hingegen aus 85 Patienten ohne jegliche genetische Voruntersuchung. Die Diagnostik der NC-Patienten verlief in analoger Weise zu den HCM-Patienten. Einschlusskriterium für die NC-Patienten waren die echokardiographischen Richtlinien von Jenni et al, demzufolge eine LVNC ab einer NC/C-Ratio größer zwei besteht. Insgesamt umfasste das Kollektiv 41 LVNC-Patienten.

Die Rekrutierung und Untersuchung der Patienten gehörte nicht zu meinen Aufgaben, sondern erfolgte durch Fachärzte für Kardiologie. Für alle durchgeführten Untersuchungen liegt ein positives Votum der Ethikkommission der Charité-Universitätsmedizin Berlin vor.

3.6 DNA-Extraktion

Die DNA wurde unter Verwendung der 1991 von Lahiri et al publizierten Aussalzmethode mithilfe von NaCl aus Vollblut extrahiert. Für die automatische Extraktion wurde der

Autopure 25TM LSTM der Firma *Genra Systems* verwendet. Die einzelnen Schritte wurden gemäß dem Protokoll OM-01969/04 RevB der Firma *Genra Systems* durchgeführt. Im Anschluss an die DNA-Extraktion erfolgte die Konzentrationsbestimmung durch Elektrophorese in einem 1.5 %-igen Agarosegel (Abschnitt 3.8) unter Zuhilfenahme eines DNA-Standards von 25 ng/ μ L. Dadurch war es möglich die DNA-Konzentration, falls nötig, richtig einzustellen. Die fertige DNA wurde anschließend bei -20°C aufbewahrt. Zu Beginn der Arbeit stand die gesamte DNA bereits als fertige Arbeitslösung mit einer Konzentration von 25 ng/ μ L zur Verfügung.

3.7 Polymerasekettenreaktion

3.7.1 Konstruktion der Primer und Festlegung der Annealingtemperatur

Die Verwendung eines spezifisch bindenden Primerpaares, *forward* (Primer F) und *reverse* Primer (Primer R), ist eine Grundvoraussetzung für die Durchführung einer erfolgreichen Polymerasekettenreaktion (PCR). Fehlende, falsche oder verschiedene Produkte können die Folge unspezifisch bindender Primer sein. Im vorliegenden Projekt wurden fehlende Primer mit dem Programm OLIGO 4.0 konstruiert. Als erstes musste die zu amplifizierende DNA-Sequenz in das Programm geladen werden. Ein optimales Primerpaare sollte folgende Charakteristika besitzen [Bangsow 2007]:

1. Die Primerpaare dürfen nicht komplementär zueinander sein, weil es sonst zur Primerhybridisierung kommen kann.
2. Die Schmelztemperatur (T_M) der zwei Primer sollte dieselbe sein, um optimale Hybridisierungsbedingungen mit der DNA zu gewährleisten. T_M ist die Temperatur bei der 50 % der DNA als Einzelstrang vorliegt.
3. Die Primerlänge wird zwischen 18-30 Nukleotide festgelegt. Zu geringe Primerlängen können zu unspezifischen Bindungen und so zur Amplifikation falscher oder verschiedener Produkte führen. Ein zu langer Primer führt zur Abnahme der Effektivität und somit zur Abnahme der DNA-Sequenzkopien [Brown 2007].
4. Die Gesamtkonzentration an Guanin und Cytosin (GC-Gehalt) sollte zwischen 40-60 % liegen. Mit wachsendem GC-Gehalt steigt die Anzahl an Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Primer und Matrize und somit die Spezifität der PCR.

5. Zur Vermeidung von Haarnadelstrukturen darf das 5'-Ende des Primers nicht komplementär zum 3'-Ende sein.
6. Für die anschließende Sequenzierung ist es wichtig, dass die Primer mindestens 20-40 bp vor dem zu sequenzierenden Bereich liegen, da die Basen am Anfang der Sequenzierung oft sehr unsauber werden.

Die richtige Annealingtemperatur (T_A) hat entscheidenden Einfluss auf den Erfolg einer PCR. Eine zu niedrige T_A kann unspezifische Bindungen des Primers zur Folge haben, während eine zu hohe T_A zur Abnahme der Bindung des Primers an die *Template*-DNA führt. Infolgedessen sinkt die Effektivität der PCR [Bangsow 2007]. In der vorliegenden Arbeit wurde zur Bestimmung der T_A ein Primergradient genutzt. Die Primer der Firma BioTeZ wurden als erstes auf eine 50 μ molare Lösung, durch Zugabe einer vom Hersteller vorgegebenen Menge an Wasser, verdünnt. Für die PCR wurde eine 1:10 Verdünnung dieser Stammlösung verwendet. Anschließend wurde ein PCR-Mastermix für zwölf *tubes* und eine Negativkontrolle, das heißt ein *tube* ohne Zusatz von DNA, wie im Abschnitt 3.7.2 erläutert, erstellt. Jeder *tube* wurde mit derselben Test-DNA bestückt. Im Anschluss durchliefen alle *tubes* ein spezielles Gradientenprogramm (Tabelle 4) im Thermocycler PTC-200 MJTM Research Gradient der Firma Biozym in dem jeder *tube* einer anderen T_A ausgesetzt ist. Mithilfe einer Gelelektrophorese (Abschnitt 3.8) erfolgte die Visualisierung der PCR-Produkte. Die T_A mit ausschließlich einem Produkt der richtigen Fragmentgröße, ermittelt durch OLIGO 4.0, ist die geeignetste T_A . Eine Übersicht der verwendeten Primer gibt Tabelle 31 im Anhang.

Tabelle 4: Gradientenprogramm für den Thermocycler PTC-200 MJTM.

Schritt	Temperatur	Zeit	Reaktion	
1.	94°C	5 min	Initiale Denaturierung	} 35-38 Zyklen (Schritt 2-5)
2.	94°C	30 s	Denaturierung	
3.	50-70°C	30 s	Hybridisierung	
4.	72°C	90 s	Elongation	
5.	75°C	5 min	Finale Elongation	
6.	4°C	∞	Kühlung	

3.7.2 Standard-PCR

Die PCR ist eine Methode zur Amplifikation von DNA-Sequenzen. Voraussetzungen sind Kenntnis über die Basenabfolge der gewünschten DNA-Sequenz, ein spezifisch bindendes Primerpaar und eine hitzestabile DNA-Polymerase um die vollständige Denaturierung des En-

zyms während des ersten Reaktionsschrittes zu verhindern. Als hitzestabile DNA-Polymerase diente die Taq-Polymerase des thermophilen Eubakteriums *Thermus aquaticus* [Bangsow 2007]. Nachteil der Taq-Polymerase ist die fehlende 3'-5'-Exonukleaseaktivität, wodurch es etwa alle 9000 Nukleotide zum Einbau falscher Desoxynukleotidtriphosphate (dNTP) kommt [Bangsow 2007, Brown 2007]. Die Fehlerrate steigt mit jedem Zyklus, da falsch eingebaute Basen als Matrize zur Verfügung stehen. Beim initialen Schritt, der Denaturierung, wird der DNA-Doppelstrang durch Zerstörung der Wasserstoffbrückenbindungen bei 94°C in seine Einzelstränge aufgespalten. Eine möglichst kurze Denaturierungszeit verhindert Beschädigungen der restlichen PCR-Bestandteile [Stewart 2007/2]. Entscheidend für die Hybridisierung, Anlagerung der Primer an die DNA-Matrize, ist die im Vorfeld festgelegte T_A . Während der Elongation, der Kettenverlängerung, wird ein neuer komplementärer Strang durch Einbau einzelner dNTPs synthetisiert. Das 3'-Ende des Primers dient hierbei als Ansatzpunkt für die Taq-Polymerase. Die Elongationszeit sollte an die Länge der DNA-Matrize angepasst sein. Unter optimalen Bedingungen steigt die DNA-Menge exponentiell. Ab ca. dem 20. Zyklus sinkt die Wachstumsrate durch Hybridisierung entstandener Produkte [Minol 1996]. Für eine möglichst hohe Ausbeute sollten 25-35 Zyklen durchlaufen werden [Bangsow 2007].

3.7.3 Durchführung der PCR

Für den PCR-Mastermix wurde ein Kit der Firma Invitex verwendet. Zu Beginn wurden Puffer, $MgCl_2$, dNTPs und Primerarbeitslösung (1:10 Verdünnung) im Heizblock bei 37°C aufgetaut. Der Zusatz eines Reaktionspuffers dient der Einstellung eines optimalen pH-Wertes für die Taq-Polymerase. Durch die Zugabe von $MgCl_2$ wird die Anlagerung der Primer, die Denaturierung und die Fehlerrate positiv beeinflusst. Zudem sind freie Magnesiumionen für die Aktivität der Taq-Polymerase nötig [Mülhardt 2009/1]. Tabelle 5 auf der nächsten Seite zeigt die Zusammensetzung des Standard-PCR-Ansatzes. Die Mengen einzelner Chemikalien wurden durch Multiplikation des PCR-Mastermixes mit der Anzahl der DNA-Proben berechnet. Entsprechend des berechneten Ansatzes wurden Wasser, Puffer, $MgCl_2$, Primer F+R und dNTPs, nachdem sie gevortext und zentrifugiert wurden, in ein Reaktionsgefäß pipettiert. Dann erfolgte die Zugabe der Taq-Polymerase, um einen Aktivitätsverlust zu verhindern. In jeden *tube* wurden nun 24 μ l Mastermix aliquotiert. Als Letztes erfolgte die Zugabe der DNA. Jede PCR enthielt eine Negativkontrolle zur Kontrolle etwaiger Verunreinigungen. Der fertige PCR-Ansatz durchlief im Thermocycler das Programm aus Tabelle 6.

Tabelle 5: Standart-PCR-Ansatz.

	17,4 μL	HPLC-Wasser
+	2,5 μL	10x NH_4 Reaction Buffer
+	1,5 μL	50mM MgCl_2
+	1,0 μL	Primer F
+	1,0 μL	Primer R
+	0,3 μL	dNTPs
+	0,3 μL	Taq DNA-Polymerase
<hr/>		
=	24,0 μL	PCR-Mastermix
+	1,0 μL	DNA
<hr/>		
=	25,0 μL	PCR-Ansatz

Tabelle 6: Thermocyclerprogramm für die Standard-PCR.

Schritt	Temperatur	Zeit	Reaktion	
1.	94°C	4min	Initiale Denaturierung	
2.	94°C	30s	Denaturierung	} 35-38 Zyklen (Schritt 2-5)
3.	Individuelle T_A	30s	Hybridisierung	
4.	72°C	45s	Elongation	
6.	72°C	4min	Finale Elongation	
7.	4°C	∞	Kühlung	

3.7.4 Optimierung der PCR

Zur Optimierung des PCR-Produkts stehen verschiedene Möglichkeiten zur Verfügung, beispielsweise die Zugabe von PCR-Additiva wie Betain oder Dimethylsulfoxid (DMSO). Diese erhöhen die Spezifität und erleichtern die Vervielfältigung besonders GC-reicher Sequenzen [Mülhardt 2009/1]. Sehr schwache PCR-Produkte können durch die Erhöhung der DNA-Templatmenge oder der Zyklenzahl gesteigert werden. Jedoch können zu hohe Mengen an DNA oder zu hohe Zyklenzahlen zur Bildung von unspezifischen Nebenprodukten oder Primerdimeren führen [Minol 1996, Mülhardt 2009/1]. Je nach Zusatz und Menge wurde der Standardansatz der PCR durch Ausgleich der entsprechenden Wassermenge neu berechnet.

3.7.5 Touchdown-PCR

Die *Touchdown*-PCR ist eine spezielle PCR-Methode zur Steigerung der Sensitivität, Spezifität und Ausbeute der PCR bei der Amplifikation schwer amplifizierbarer *templates*, wie sehr GC-reiche Regionen. Das Hauptmerkmal der *Touchdown*-PCR ist der zyklusweise Abfall der T_A zwischen 0,5°C und 1,0°C. Eine hohe Anfangs- T_A sorgt für eine sehr spezifische Bindung des Primers an das *template* und vermeidet die Bildung unspezifischer Nebenprodukte

oder Primerdimere. Nach der *Touchdown*-Phase folgt die Amplifikationsphase, welche im Ablauf der Standard-PCR entspricht [Don 1991, Korbie 2008]. Der Ansatz für die *Touchdown*-PCR konnte in derselben Weise wie der der Standard-PCR erstellt werden. Hierzu wurde ein Kit der Firma Epicentre Biotechnologies verwendet. Die Zusammensetzung zeigt Tabelle 7. Für das *Touchdown*-Programm [Taylor 2004] aus Tabelle 8 kam der Thermocycler PTC-200 MJTM *Research* der Firma Biozym zum Einsatz.

Tabelle 7: Ansatz für die Touchdown PCR.

	13,4 μL	HPLC-Wasser
+	2,5 μL	PCR-Puffer
+	1,5 μL	MgCl ₂
+	4,0 μL	Enhancer
+	1,0 μL	Primer F
+	1,0 μL	Primer R
+	0,3 μL	dNTPs
+	0,3 μL	Ampli Therm DNA-Polymerase
=	24,0 μL	PCR-Mastermix
<hr/>		
+	1,0 μL	DNA
<hr/>		
=	25,0 μL	PCR-Ansatz

Tabelle 8: Thermocyclerprogramm für die *Touchdown*-PCR [Taylor 2004].

Schritt	Temperatur	Zeit	Reaktion
1.	95°C	10min	Initiale Denaturierung
2.	95°C	20s	Denaturierung
3.	64°C (-0,5°C/Zyklus)	1min	Hybridisierung
4.	72°C	1min	Elongation
5.	<i>go to 2</i> ; 14 Zyklen		
6.	94°C	20s	Denaturierung
7.	57°C	1min	Hybridisierung
8.	72°C	1min	Elongation
9.	<i>go to 6</i> ; 20 Zyklen		
10.	72°C	10min	Finale Elongation
11.	4°C	∞	Kühlung

3.8 Gelelektrophorese

Zur Kontrolle der PCR wurden die PCR-Produkte auf ein 3 %-iges Agarosegel aufgetragen. Die verwendete Agarose der Firma Biozym ist ein Polysaccharid, gewonnen aus roten Meeresalgen [Dechert 2007]. Zuerst wurden Agarose und 1x TRIS-Borat-EDTA-Puffer (TBE-Puffer), hergestellt aus 5x TBE-Puffer, in der Mikrowelle erhitzt und danach mit

Ethidiumbromid zur Färbung der DNA versetzt. Das flüssige Gel wurde in die Gelkammern gegeben. Die Zusammensetzungen der Gele und des 5x TBE-Puffers zeigen Tabelle 9 und 10.

Tabelle 9: Ansätze für 3%ige Agarosegele.

	Kleines Gel	Großes Gel
1x TBE-Puffer	20,0 ml	100,0 ml
Agarose	0,6 g	3,0 g
Ethidiumbromid	1,5 µl	7,5 µl

Tabelle 10: Zusammensetzung des 5x TBE-Puffers.

Chemikalien	Menge	Konzentration
TRIS	54 g	
Borsäure	27,5 g	
EDTA-Lösung	20,0 ml	0,5 mol/l
dH ₂ O	1000,0 ml	

TRIS-Tris(hydroxymethyl)-aminomethan

Nach dem Auspolymerisieren der Gele wurde die Gelkammer mit 1x TBE-Puffer als Leiter versetzt. In die Geltaschen mussten je 2 µl PCR-Produkt mit 2 µl Auftragspuffer pipetiert werden. Der Auftragspuffer erhöht die Dichte der DNA und sorgt für ein Absinken der Proben in die Geltaschen. Er enthält Bromphenolblau und Xylencyanol, zwei Farbstoffe, um das Laufverhalten der DNA-Fragmente zu beobachten [Mülhardt 2009/1]. Zur Ermittlung der Fragmentgröße des PCR-Produkts wurde in jeder Reihe ein Molekulargewichtsmarker Typ VIII (MVIII) der Firma MBI Fermentas mitgeführt. Dieser enthält standardisierte DNA-Fragmente verschiedener Größe. Die Gelkammern wurden bei 80 V an das Elektrophoresengerät angeschlossen. Aufgrund negativ geladener DNA-Phosphatreste wanderten die PCR-Produkte zur Anode. Je kürzer das Fragment, desto länger die Laufstrecke. Für eine optimale Auswertung betrug die Laufzeit 30 min für kleine Gele und 50 min für große Gele. Die Visualisierung und Auswertung der Fragmente erfolgte am UV-Tisch (Abb. 3.1).

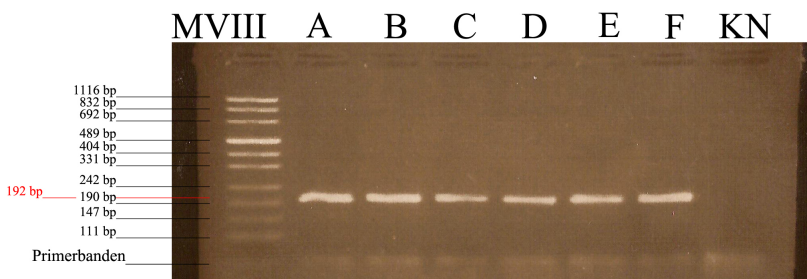


Abbildung 3.1: Ergebnis der Gelelektrophorese am Beispiel von Exon 9 mit Test-DNA (A, B, C, D, E, F). Die Größe des PCR-Produkts ist rot markiert. MVIII - Molekulargewichtsmarker, KN - negative Kontrolle.

3.9 Sequenzierung

3.9.1 Zyklussequenzierung/ *thermal cycle sequencing*

Das *thermal cycle sequencing* ist eine Methode zur Analyse unbekannter DNA-Sequenzen. Sie vereint die PCR und die Kettenabbruchmethode nach Sanger, Didesoxynukleotidverfahren [Bangsow 1996]. Die Kettenabbruchmethode ist ein Analyseverfahren zur Bestimmung der Basensequenz von DNA-Abschnitten. Dabei werden mithilfe einer DNA-Polymerase und der zu sequenzierenden DNA, die als Matrize dient, neue DNA-Fragmente synthetisiert [Meckelein 2007].

Als Erstes werden vier gleiche Ansätze bestehend aus Matrizen-DNA, Primer, dNTPs und DNA-Polymerase hergestellt. Danach erfolgt die Zugabe von fluoreszenzmarkierten Didesoxyribonukleotidtriphosphaten (ddNTP). Jeder Ansatz wird mit einem anderen ddNTP versetzt. Es laufen parallel dieselben Reaktionen ab. Nach der Denaturierung findet die Hybridisierung zwischen DNA-Matrize und Sequenzprimer statt. Der Einbau der Nukleotide folgt dem Zufallsprinzip, da die DNA-Polymerase mit dNTPs und ddNTPs arbeiten kann. Wird ein ddNTP eingebaut, kommt es aufgrund der fehlenden 3'-Hydroxygruppe zum Kettenabbruch [Brown 2007, Meckelein 2007]. Am Ende enthält jedes Mikroreaktionsgefäß zahlreiche, unterschiedlich lange DNA-Fragmente die am 5'-Ende den Primer und am 3'-Ende ein spezifisches ddNTP tragen. Die vier Ansätze werden auf einem Polyacrylamidgel nebeneinander aufgetragen. Der zur Matrizen-DNA komplementäre Strang wird anhand des Gelmusters bestimmt [Meckelein 2007]. Beim *thermal cycle sequencing* wird die manuelle Auswertung durch automatische Sequenzanalyse im DNA-Sequenziergerät ersetzt. Es ist nur ein Ansatz nötig, da jedes ddNTP mit einem anderen Fluoreszenzfarbstoff markiert ist (siehe Tabelle 11). Der Fluoreszenzdetektor erkennt die Basen anhand spezifischer Absorptionsmaxima.

Tabelle 11: Verwendete ddNTPs und ihre Fluoreszenzfarbstoffe.

Absorptionsmaximum	Fluoreszenzfarbstoff	Base
531 nm	Blau	C
560 nm	Grün	A
580 nm	Gelb	G
610 nm	Rot	T

Die Elektrophorese der Proben erfolgt durch Kapillaren. Die Nutzung von Kapillarbündeln (*capillary arrays*) erlaubt die gleichzeitige Messung verschiedener Proben. Nach Anregung der fluoreszenzmarkierten ddNTPs durch einen Argonlaser wandern die negativ geladenen

DNA-Moleküle zur positiv geladenen Kapillare. Durch lineare DNA-Amplifikation werden nur geringe Mengen DNA benötigt. Die Taq-Polymerase hilft aufgrund höherer Reaktionstemperaturen die Bildung komplexer Sekundärstrukturen zu vermeiden [Meckelein 2007].

3.9.2 Durchführung der Sequenzierung

Herstellung der Sephadexplatte Sephadex ist ein vernetztes Dextran, welches zusammen mit Wasser ein Gel zur Filtration des Sequenzierprodukts bildet [CHEMIE.DE]. Das Sephadexpulver wurde mittels Einführhilfe auf ein *96-Well Plate* des MultiScreen® Assay Systems überführt und mit je 300 µl Wasser versetzt. Es musste 24 h bei 4°C quellen.

Enzymatische Aufreinigung Die Sauberkeit der DNA ist entscheidend für den Erfolg der Sequenzierung. Um die PCR-Produkte direkt zu sequenzieren, wurde ein Exonuklease-Phosphatase Verdau durchgeführt. Die Exonuklease verdaut einzelsträngige DNA, z.B. Primer. Die Shrimp Alkaline Phosphatase hydrolysiert noch enthaltene dNTPs [Mülhardt 2009/2]. Verbliebene Nukleotide verändern das dNTP/ddNTP Verhältnis und Primerreste beeinflussen die Bindung des Sequenzierprimers an die DNA [Meckelein 2007, Mülhardt 2009/2]. Zuerst wurde der Mastermix erstellt (Tabelle 14), in die einzelnen *tubes* pipettiert und mit dem PCR-Produkt versetzt. Alle Chemikalien standen im Kryoblock und wurden nicht gevortext. Die Proben durchliefen das Programm aus Tabelle 13 im Thermocycler UNO-Thermoblock. Durch die Hitzelabilität der Enzyme haben diese keinen Einfluss auf die Sequenzierung.

Tabelle 12: Ansatz für die enzymatische Aufreinigung der PCR-Produkte.

	0,09 µL	Exonuklease
+	0,32 µL	Shrimp Alkaline Phosphatase
+	2,59 µL	HPLC-Wasser
<hr/>		
=	3 µL	Mastermix
+	7 µL	PCR-Produkt
<hr/>		
=	10 µL	Ansatz

Tabelle 13: Thermocyclerprogramm für die Enzymatische Aufreinigung.

Schritte	Temperatur	Zeit
1.	37°C	30 min
2.	72°C	15 min

Sequenzierung Nach erfolgreicher Aufreinigung folgt die Sequenzierung. Verwendet wurde das Sequenzierkit der Firma *Applied Biosystems*. Zu Beginn wurde der Mastermix (Tabelle

14) erstellt und in die auf einem Kryoblock befindlichen *tubes* aliquotiert. Danach konnte das aufgereinigte PCR-Produkt hinzugefügt werden. Alle verwendeten Chemikalien wurden zuvor gevortext und zentrifugiert. Den Ablauf des Thermocyclerprogramms zeigt Tabelle 15.

Tabelle 14: Ansatz für die Sequenzierung.

	0,5 µL	Big Dye® Terminator v1.1
+	1,75µL	5x Sequenzierpuffer
+	1,0 µL	Primer F oder R
+	4,75 µL	HPLC-Wasser
<hr/>		
=	8,0 µL	Mastermix
+	2,0 µL	aufgereinigtes PCR-Produkt
<hr/>		
=	10,0 µL	Sequenzieransatz

Tabelle 15: Thermocyclerprogramm für das *cycle sequencing*.

Schritt	Temperatur	Zeit	Reaktion	
1.	96°C	1 min	Initiale Denaturierung	
2.	96°C	10 s	Denaturierung	} 25 Zyklen
3.	50°C	30 s	Primerhybridisierung	
4.	60°C	4 min	Elongation	
5.	4°C	∞	Kühlung	

Überführung der Proben auf die Mikrotiterplatte für den Sequenzierautomat

Die vorbereitete Sephadexplatte wurde zunächst fünf Minuten bei 1000 g zentrifugiert und vom Wasserüberstand befreit. Das Wasser wurde in einem *waste plate* aufgefangen und verworfen. Nach einem weiteren Waschschrift mit 150 µL HPLC-Wasser wurde die Sequenzierplatte vorbereitet. In jedes *well* wurden 13 µL Hi-DiTM Formamide pipettiert. Danach erfolgte die Überführung der Sequenzierprodukte in die 96 *well* Sephadexplatte. Durch anschließende Zentrifugation wurden die Sequenzierprodukte durch die Sephadexplatte gefiltert und gelangten so in die vorbereitete Sequenzierplatte. Bis zur Verarbeitung im Sequenzierautomaten *ABI Prism 3100-Avant Genetic Analyzer* konnte die Platte tiefgefroren werden. Die Auswertung der Elektropherogramme erfolgte mit dem Programm SEQUENCHER 4.1.

3.10 Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus

3.10.1 Definition

Der Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (RFLP) ist eine weitere Methode der DNA-Analyse. Er wurde es genutzt um gefundene Mutationen zu bestätigen und diese in einem

Kontrollkollektiv von 300 herzgesunden Probanden mit normaler Herzgröße und -funktion auszuschließen. Die Methode beruht auf der Spaltung gewünschter DNA-Abschnitte in einzelne Fragmente spezifischer Länge durch Restriktionsendonukleasen. Diese erkennen spezifische DNA-Sequenzen von meist 4-6 bp Länge und schneiden sie. Durch Mutationen können bestehende Restriktionsschnittstellen verloren gehen oder Neue entstehen. Zur Visualisierung und zum Vergleich der Fragmentlängen dient eine Gelelektrophorese [Mülhardt 2009/2].

3.10.2 Durchführung

Mithilfe des Computerprogrammes SEQUENCHER 4.1 wurden Exon 7 und Exon 10 auf Restriktionsschnittstellen untersucht. Anschließend wurde durch Austausch der mutierten Base geschaut, ob eine Änderung der Restriktionsschnittstellen im betroffenen Kodon stattfindet. Dies war bei Exon 7 und 10 der Fall. Nach erfolgreicher Amplifikation von Exon 7 und 10 bei allen 300 Kontrollpersonen wurde mit dem entsprechenden Restriktionsenzym ein spezifischer RFLP-Ansatz erstellt und mit dem gewünschten PCR-Produkt versetzt. Die Ansätze für den Restriktionsverdau der einzelnen Exons wurden entsprechend der Herstellerangaben des jeweiligen Enzyms berechnet (siehe Tabelle 16). Für den Restriktionsverdau mit BsiHKA I musste BSA, *Bovine Serum Albumin*, in einer 1:10 Verdünnung als zusätzlicher Puffer verwendet werden. Es verhindert die Adhäsion von Restriktionsenzymen an Reaktionsgefäße oder Pipettenspitzen und hilft bei der Stabilisierung von Proteinen während der Inkubation.

Tabelle 16: Ansätze für den Restriktionsverdau.

(a) Exon 7.			(b) Exon 10.		
	0.3 µL	Hae III		0.3 µL	BsiHKA I
+	1.0 µL	NEBuffer 2	+	1.0 µL	NEBuffer 3
+	5.7 µL	HPLC-Wasser	+	1.0 µL	BSA (1:10)
	7.0 µL	RFLP-Mastermix	+	4.7 µL	HPLC-Wasser
+	3.0 µL	PCR-Produkt	=	7.0 µL	RFLP-Mastermix
	10.0 µL	RFLP-Ansatz	+	3.0 µL	PCR-Produkt
			=	10.0 µL	RFLP-Ansatz

Jede Probe wurde im Thermocycler bei 37°C drei Stunden verdaut. Zur Gegenüberstellung der Bandenmuster wurden die zu untersuchende Probe, der MVIII, ein unverdautes PCR-Produkt und eine positive Kontrolle, eine Probe mit Mutationsnachweis, im 3 %-igen Agarosegel nebeneinander aufgetragen. Aufgrund des geringen DNA-Gehalts musste das gesamte Produkt von 10 µL in die Geltaschen pipettiert werden.

4 Ergebnisse

4.1 Übersicht der einzelnen Arbeitsschritte

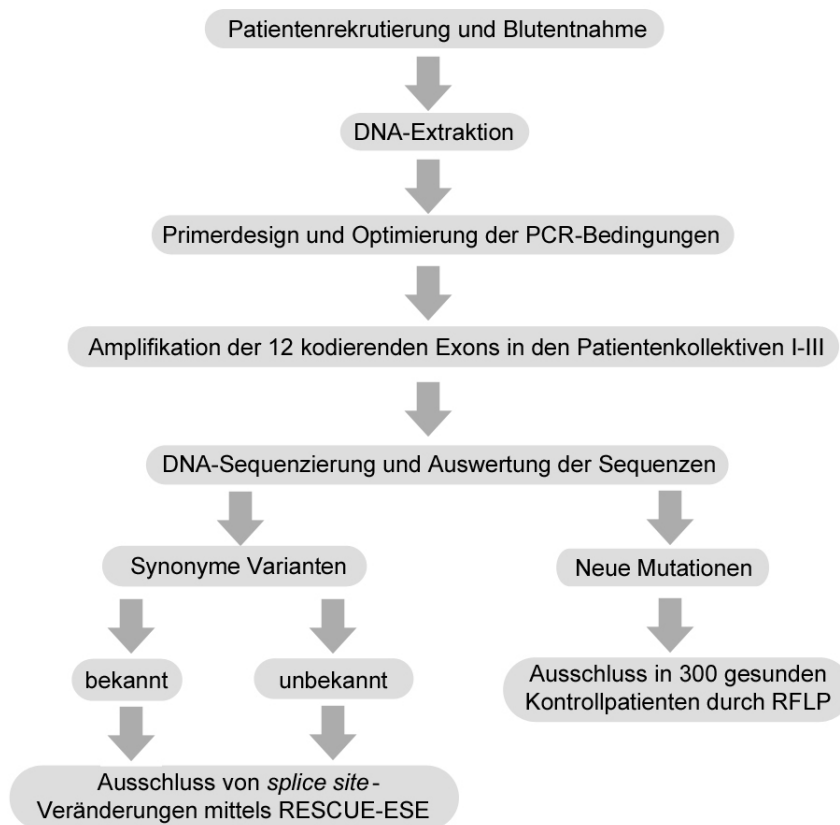


Abbildung 4.1: Arbeitsablauf

4.2 Ergebnisse der PCR

4.2.1 Grundsätze der Optimierung

Zur Ermittlung der T_A wurde für jedes Exon ein Primergradient entsprechend der Anleitung in Abschnitt 3.7.4 und eine Optimierung durchgeführt. Das Programm durchlief Temperaturen von 50-70 °C. Die PCR-Produkte wurden dann wie in Abschnitt 3.8 auf ein Agarosegel aufgetragen und die Banden mit der im Vorfeld über OLIGO 4.0 ermittelten Produktgröße verglichen. Im Falle einer Uneindeutigkeit wurde das Programm auf eine kleinere Temperaturspanne eingestellt und der Ablauf wiederholt. Stimmt die Länge des DNA-Fragmentes, wurde die passende T_A notiert und eine Probe-PCR mit Test-DNA durchgeführt. Die Optimierung der PCR wird im Folgenden an vier verschiedenen Beispielen erläutert.

4.2.2 Festlegung der T_A und Kontrolle des PCR-Produkts anhand von Exon 9

Nach Ermittlung der Größe des PCR-Produkts mithilfe des Programms OLIGO 4.0 wurde ein Standard-PCR-Ansatz für 12 *tubes* und eine zusätzliche Negativkontrolle gemäß Abschnitt 3.7.3 hergestellt. Jeder *tube* wurde mit 24 μL und 1 μL Test-DNA versehen und durchlief das Gradientenprogramm im Thermocycler PTC-200 MJTM Research Gradient. Das Ergebnis der Gelelektrophorese für Exon 9 zeigt Abbildung 4.2.

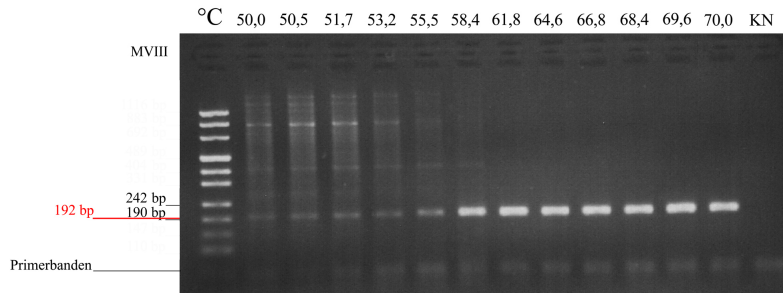


Abbildung 4.2: Temperaturgradient für Exon 9. Die richtige Größe des PCR-Produkts ist rot gekennzeichnet. MVIII - Molekulargewichtsmarker, bp - Basenpaar, KN - negative Kontrolle.

Die Abbildung zeigt für die Temperaturen zwischen 61,8 °C und 70,0 °C das spezifische PCR-Produkt für Exon 9 von 192 bp. Die T_A wurde auf 67 °C festgelegt. Im nächsten Schritt wurde eine PCR mit Test-DNA angefertigt. Dieser Ansatz durchlief das Standard-PCR-Programm (Abschnitt 3.7.3) mit 35 Zyklen. Da die PCR kräftige spezifische Banden der gewünschten Größe zeigt, konnte der Versuch mit Patienten-DNA wiederholt werden. Abbildungen 4.3 zeigt die Ergebnisse der Probe-PCRs mit Test- und Patienten-DNA. Weitere Optimierungen für Exon 9 waren nicht nötig. In analoger Weise erfolgte die Bestimmung der PCR-Bedingungen für Exon 2, 4, 5, 6, 7, 10 und 11 aus Tabelle 17 auf der nächsten Seite.

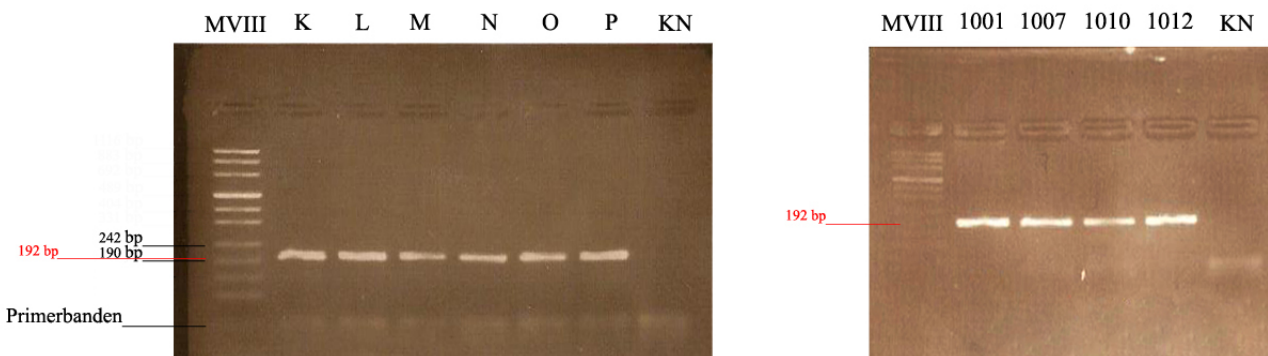


Abbildung 4.3: Links - PCR-Ergebnis mit Test-DNA (K, L, M, N, O, P). Rechts - PCR-Ergebnis mit Patienten-DNA (1001, 1007, 1010, 1012). MVIII - Molekulargewichtsmarker, bp - Basenpaar, KN - negative Kontrolle.

Tabelle 17: PCR-Bedingungen für Exon 2, 4, 5, 6, 7, 9, 10 und 11.

Exon	Länge des PCR-Produkts	T_A	Zyklenzahl	PCR-Ansatz
2	267 bp	56 °C	35	Standard
4	334 bp	64 °C	35	Standard
5	432 bp	57 °C	35	Standard
6	466 bp	58 °C	35	Standard
7	292 bp	58 °C	35	Standard
9	192 bp	67 °C	35	Standard
10	459 bp	60 °C	35	Standard
11	395 bp	63 °C	35	Standard

4.2.3 Optimierung schwacher Banden am Beispiel von Exon 8

Die Durchführung des Temperaturgradienten für Exon 8 ergab bei 67 °C spezifische Banden der richtigen DNA-Fragmentlänge. Diese wurde analog zu den restlichen Exons ermittelt und beträgt 286 bp. Die Banden waren sehr schwach und mussten über mehrere Zwischenschritte optimiert werden. Abbildung 4.4 zeigt, dass die PCR mit Patienten-DNA noch schwächere Banden als mit Test-DNA liefert.

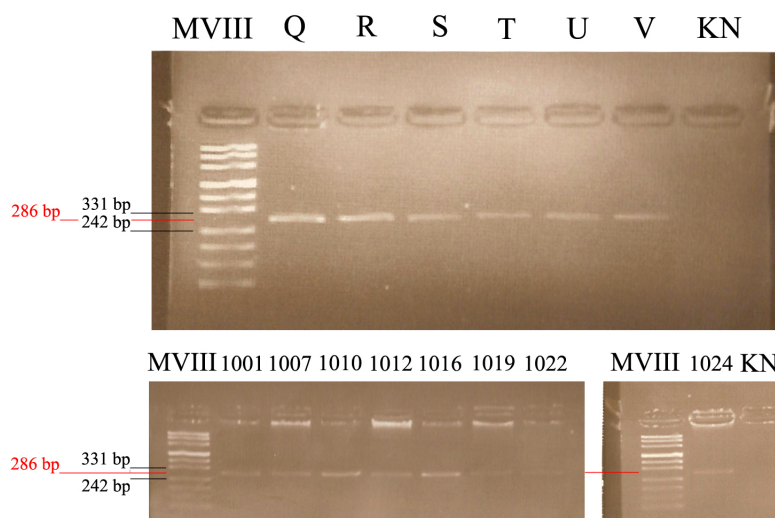


Abbildung 4.4: PCR-Ergebnisse für Exon 8 ohne jegliche Zusätze, mit Test- (Q, R, S, T, U, V) und Patienten-DNA (1001, 1007, 1010, 1012, 1016, 1019, 1022). Das im Vorfeld ermittelte PCR-Produkt ist rot dargestellt (286 bp). MVIII - Molekulargewichtsmarker, bp - Basenpaar, KN - negative Kontrolle.

Um die Ausbeute des PCR-Produkts zu erhöhen wurden Versuche mit DMSO und Betain durchgeführt (Abb. 4.5). Während die Zugabe von DMSO nicht zum gewünschten Ergebnis führte, brachte die Zugabe von Betain bereits eine deutliche Besserung. Um die trotz allem noch schwachen Banden zu verbessern, wurde die DNA-Templatmenge von einem auf zwei Mikroliter erhöht und die PCR auf 38 Zyklen umgestellt (Abb. 4.6).

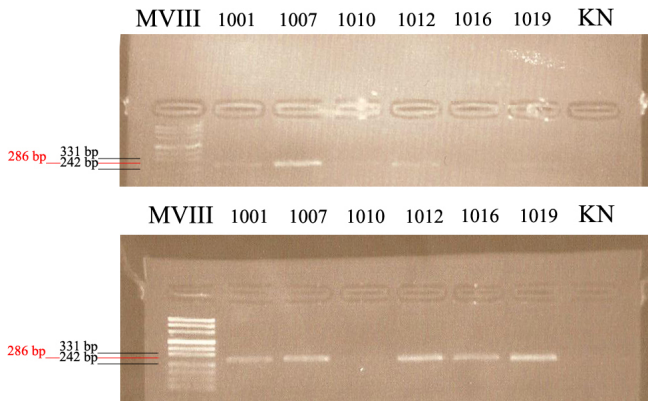


Abbildung 4.5: Zwischenschritte der PCR-Optimierung von Exon 8 mit Patienten- DNA (1001, 1007, 1010, 1012, 1016, 1019). Obere Abb. - Zusatz von DMSO. Untere Abb. - Zusatz von Betain. MVIII - Molekulargewichtsmarker, bp - Basenpaar, KN - negative Kontrolle.

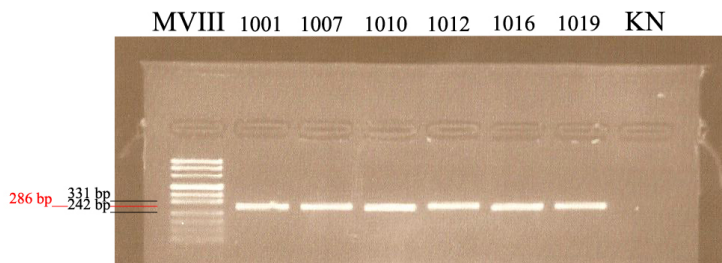


Abbildung 4.6: Ergebnisse der optimierten PCR für Exon 8 mit 2.5 µL Betain, 2 µL Patienten-DNA (1001, 1007, 1010, 1012, 1016, 1019) und 38 Zyklen. MVIII - Molekulargewichtsmarker, bp - Basenpaar, KN - negative Kontrolle.

Die Optimierung des PCR-Produkts von Exon 3 erfolgte in Analogie zu Exon 8. Auf die Erhöhung der Zyklenzahl konnte jedoch verzichtet werden. Tabelle 18 zeigt die optimierten PCR-Bedingungen beider Exons.

Tabelle 18: PCR-Bedingungen für Exon 3 und Exon 8.

Exon	Länge des PCR-Produkts	T_A	Zyklenzahl
3	250	61.4 °C	35
8	286	67 °C	38

4.2.4 Optimierung unspezifischer Nebenprodukte anhand von Exon 12

Die Ergebnisse des PCR-Gradienten für Exon 12 ergaben, dass die Primer bei 58°C zur Amplifikation des gewünschten PCR-Produkts von 686 bp Länge führen, jedoch entstand eine zusätzliche Bande als Zeichen eines unspezifischen Nebenprodukts mit einer ungefähren Größe von 370 bp (Abb.) 4.7. Solche Banden können das Ergebnis der Sequenzierung deutlich negativ beeinflussen, weshalb weitere Optimierungen durchgeführt werden mussten. Zur

Minderung der unspezifischen Nebenprodukte wurde zum einen die eingesetzte Primermenge auf 0.8 μL pro *tube* reduziert und zum anderen wurde Betain hinzugefügt um die Spezifität der Primer zusätzlich zu steigern. Das Endprodukt der optimierten PCR-Bedingungen ohne Nebenprodukt demonstriert Abbildung 4.8. Die PCR-Bedingungen zeigt Tabelle 19.

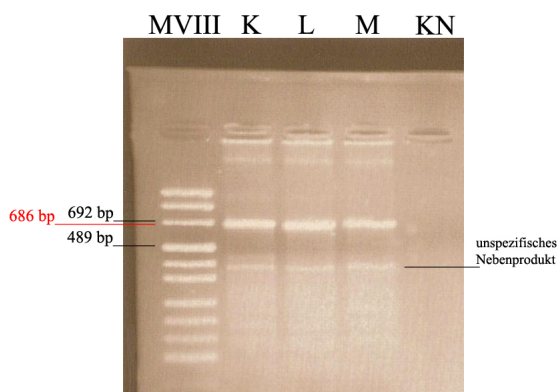


Abbildung 4.7: PCR-Ergebnis von Exon 12 mit Test-DNA (K, L, M) ohne Optimierung. Das PCR-Produkt ist rot markiert (686 bp). MVIII - Molekulargewichtsmarker, bp - Basenpaar, KN - negative Kontrolle.

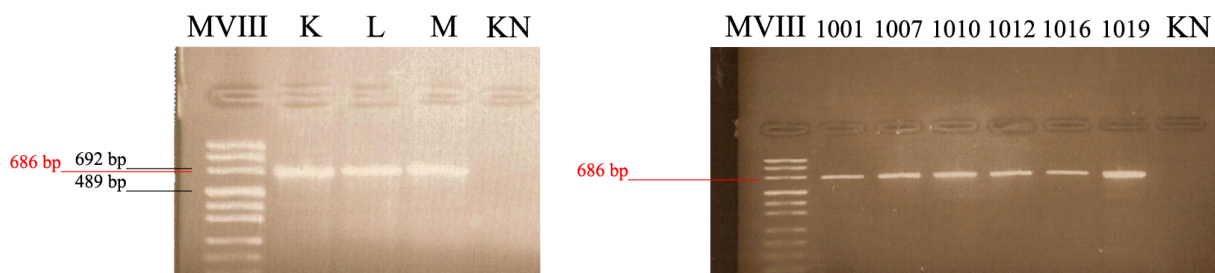


Abbildung 4.8: PCR-Ergebnis von Exon 12 nach Abschluss der Optimierung. Die exakte Größe des PCR-Produkts ist rot hervorgehoben. MVIII - Molekulargewichtsmarker, bp - Basenpaar, KN - negative Kontrolle.

Tabelle 19: PCR-Bedingungen für Exon 12.

Exon	Länge des PCR-Produkts	T_A	Zyklenzahl
12	436	58	35

4.2.5 Erhöhung der Spezifität durch Verwendung einer *Touchdown-PCR* am Beispiel von Exon 1

Trotz optimaler Primereigenschaften führten drei verschiedene Primer weder mit noch ohne Betain zur spezifischen Amplifikation von Exon 1. Abbildung 4.9 zeigt dies anhand des Temperaturgradienten für den Primer 1.3 mit einem theoretischen PCR-Produkt von 570 bp.

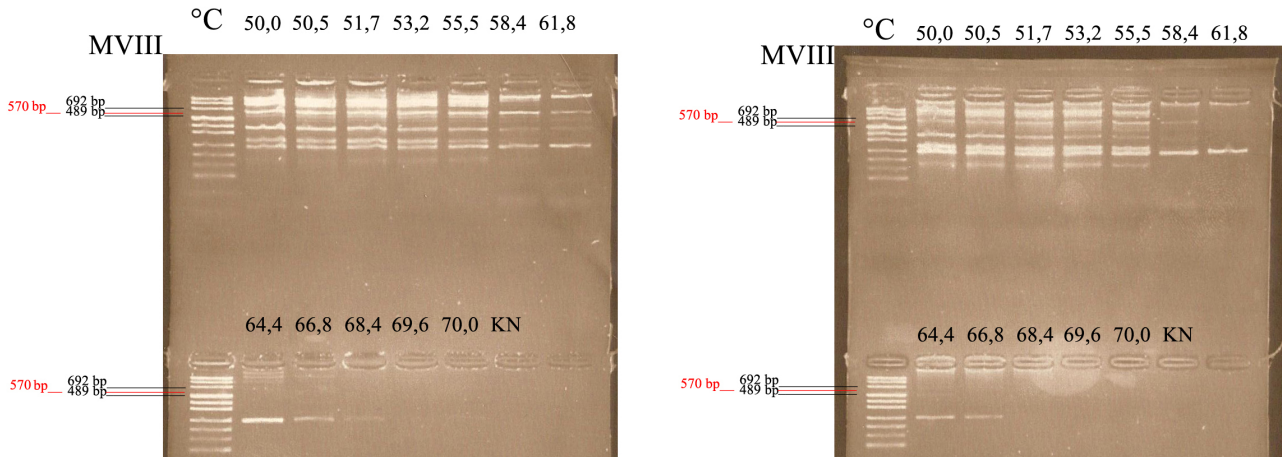


Abbildung 4.9: Temperaturgradienten für das Primerpaar 1.3. Links- ohne Betain. Rechts- mit Betain. Das PCR-Produkt ist rot markiert. MVIII - Molekulargewichtsmarker, bp - Basenpaar, KN - negative Kontrolle.

Um die Bindung der Primer an die DNA zu steigern und ein spezifisches PCR-Produkt zu generieren, entschied ich mich für den Gebrauch einer *Touchdown*-PCR. Verwendet wurden das Touchdown-Programm und die Primer von Taylor et al [Taylor 2004]. Vor der Nutzung wurde das Primerpaar 1.4 zusätzlich mittels OLIGO 4.0 auf seine Eigenschaften überprüft. Der erste Versuch mit dem PCR-Kit der Firma Invitak führte nicht zum gewünschten Ergebnis, weswegen es durch das PCR-Kit der Firma Epicentre Biotechnologies, das eine AmpliTherm-DNA-Polymerase enthält, ersetzt wurde. Die Kombination aus AmpliTherm und Touchdown-PCR führte anschließend zur erfolgreichen Amplifikation von Exon 1 (Abb. 4.10). Die optimierten PCR-Bedingungen veranschaulicht Tabelle 20.

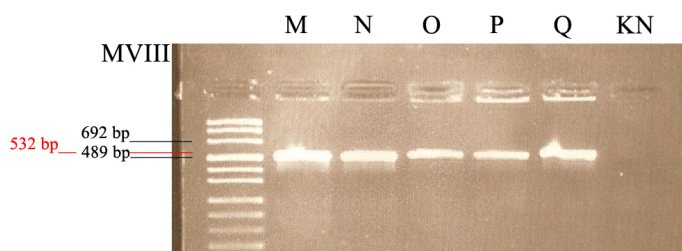


Abbildung 4.10: Ergebnis der Touchdown-PCR mit AmpliTherm-DNA-Polymerase.

Tabelle 20: PCR-Bedingungen für Exon 1.

Exon	Länge des PCR-Produkts	Start- T_A
1	532	64 °C

4.3 Ergebnisse der Sequenzierung

4.3.1 Übersicht der Ergebnisse

In allen drei verschiedenen Patientenkollektiven konnten, bei jedem Patienten, alle zwölf kodierenden Exons des LMNA-Gens erfolgreich amplifiziert und sequenziert werden. Um ein bestmögliches Ergebnis zu erzielen wurde zunächst der Primer verwendet, welcher den größeren Abstand zum gewünschten DNA-Fragment besaß. Es spielte keine Rolle ob es sich um den *forward* oder *reverse* Primer handelte. Alle Sequenzen wurden mithilfe des Programms SEQUENCHER 4.1 ausgewertet. Als Referenz diente das Transkript LMNA-001 (ENST00000368300) der genomischen Datenbank *ensemble* [ensemble.org].

Insgesamt wurden zwei neue *missense*-Mutationen, vier neue synonyme Varianten und eine bisher unbekannte intronische Variante gefunden. Zudem konnten acht bereits bekannte SNPs nachgewiesen werden. Diese wurden mit der genomischen Datenbank *Ensemble* bzw. der *Database for Single Nucleotide Polymorphisms (dbSNP)* abgeglichen. Zur Validierung der gefundenen Varianten und zur Kontrolle der Probandennummer im entsprechenden Kollektiv wurde jede Probe mit einer Variante durch Wiederholung der Versuche bestätigt. Zunächst erfolgte die Sequenzierung des vorhandenen PCR-Produkts in Gegenrichtung. Anschließend wurden mindestens zwei neue PCRs durchgeführt. Deren Produkte wurden *forward* und *reverse* sequenziert. Alle bekannten synonymen SNPs und neuen synonymen Varianten wurden mithilfe des Programms RESCUE-ESE auf Veränderungen eventueller *splice sites* untersucht. Diese stellten sich in jedem Fall als negativ heraus. Als Beispiel dient die Darstellung der *splice sites* in der Umgebung der neu entdeckten intronischen Variante c.936+12C>T im Intron 5-6.

4.3.2 Probleme der Sequenzierung

Während der Auswertung der Elektropherogramme zeigte sich bei einigen Sequenzen, dass diese aus verschiedenen Gründen nicht auswertbar waren, wie beispielweise bei Exon 9. Das Problem bestand in dem zu geringen Abstand der beiden Primer zum gewünschten DNA-Abschnitt. Dieser sollte 20 bis 40 bp betragen, weil die ersten Basen der Sequenzierung zumeist sehr unsauber werden. Für Exon 9 betrug der Abstand des *forward*-Primer jedoch nur zehn Basen und für den *reverse*-Primer elf Basen. Da die Amplifikation des Exons mithilfe der PCR tadellos funktionierte, entschied ich mich die Primer beizubehalten. Jede Probe wurde

deswegen in beide Richtungen sequenziert und die Elektropherogramme gegen die Referenz und untereinander verglichen. Abbildung 4.11 zeigt beispielhaft das Ende von Exon 9 einmal mit dem *forward* und einmal mit dem *reverse* Primer sequenziert.

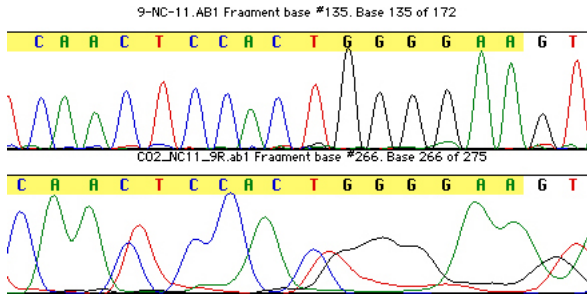


Abbildung 4.11: Sequenzausschnitte des Endes von Exon 9 zum Vergleich der Sequenziererergebnisse mit dem *forward* (obere Leiste) und dem *reverse* (untere Leiste) Primer. Es wird deutlich, dass in diesem Bereich nur die forward-Sequenz auswertbar ist. Der Exonbereich ist gelb hinterlegt.

Ein weiteres Problem war die Sequenzierung von schwachen PCR-Banden, wie es bei Exon 3 und 8 der Fall war. Durch die geringe Menge an PCR-Produkt war folglich auch das Signal der einzelnen Basen für den Fluoreszenzdetektor nicht so stark. Durch die niedrige Amplitude der Elektropherogrammkurven war es schwer und zum Teil nicht möglich schwer lesbare Stellen von Varianten zu unterscheiden. Die Optimierung der PCR Bedingungen führte zur gewünschten Verbesserung des Sequenziererergebnisses, wie Abbildung 4.12 für Exon 3 belegt.

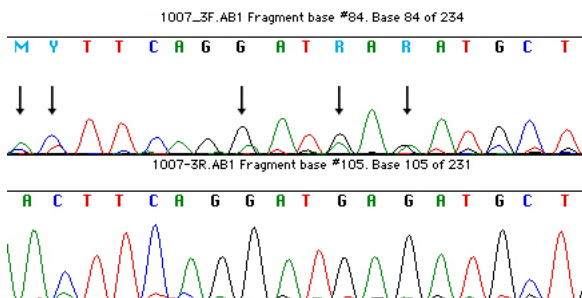


Abbildung 4.12: Gegenüberstellung der DNA-Sequenzen von Exon drei vor (obere Leiste) und nach (untere Leiste) der Optimierung des PCR-Produkts. Pfeile markieren schwer lesbare Stellen.

4.3.3 Bekannte SNPs

Wie anfangs erwähnt, konnten acht unterschiedliche bereits bekannte synonyme SNPs nachgewiesen werden, darunter ein intronischer und sieben in kodierenden Abschnitten, jeweils an der dritten Kodonposition. Tabelle 21 am Ende des Abschnitts gibt eine Übersicht über die gefundenen synonymen bekannten SNPs und deren Verteilung in den einzelnen Kollektiven und im Vergleich zu verschiedenen Referenzpopulationen.

Nach erfolgreicher Amplifikation von Exon 1 mittels *Touchdown*-PCR wurde in vier HCM- und einem NC-Patienten der SNP rs11549668 nachgewiesen. Der Basenaustausch von Cytosin (C) zu Thymin (T) an Position 51 der cDNA (c.51C>T), führt zur Kodonänderung von AGC zu AGT. Die neutrale AS Serin bleibt erhalten (p.Ser17Ser). Die unterschiedlichen Genotypen können in Abbildung 4.13 verglichen werden.

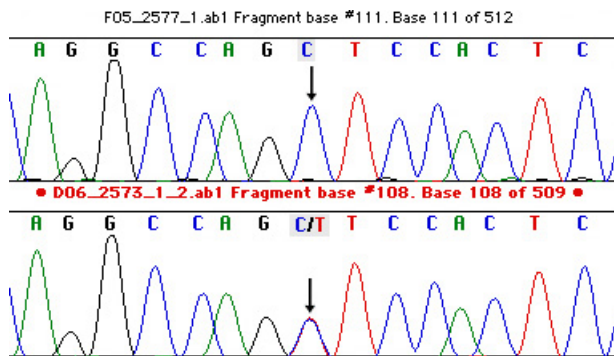


Abbildung 4.13: Elektropherogramme von Exon 1. Gegenüberstellung des Wildtyps (obere Leiste; Probe 2577) und des SNP rs11549668 (untere Leiste; Probe 2573) an Position 51 (Pfeil).

Alle PCR-Produkte von Exon 2 konnten problemlos mit dem *reverse*-Primer sequenziert und ausgewertet werden. Patient 2530 aus K2 trug einen bereits bekannten SNP, der die Referenznummer rs41313880 trägt. C wird durch T an Position 357 der cDNA substituiert (c.357C>T). Obwohl Cytosin die erste Base von Exon 2 ist, nimmt sie nach dem Spleißvorgang die dritte Position im Kodon 119 ein. GCG, wie auch GCT, kodieren für die basische AS Arginin (p.Arg119Arg). Die unterschiedlichen DNA-Sequenzen zeigen die Elektropherogramme in Abbildung 4.14.

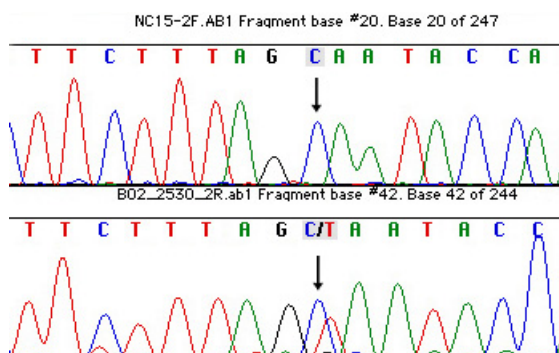


Abbildung 4.14: Sequenzausschnitt des Chromatogramms von Exon 2. Darstellung des SNPs rs41313880 an Position 357 der cDNA (untere Leiste; Patient 2530) im Vergleich zum Wildtyp (obere Leiste; Patient NC15). Beide sind durch eine Pfeil gekennzeichnet.

Sowohl in HCM- als auch in NC-Patienten konnte in Exon 3 der heterozygote SNP rs12117552 identifiziert werden. Durch den Austausch der Base Guanin (G) zu Adenin (A) (c.612G>A),

ändert sich das Wildtyptriplett CTG von Kodon 204 zu CTA (p.Leu204Leu). Die neutrale AS Leucin bleibt unverändert. In Abbildung 4.15 sind beide Genotypen gegenübergestellt.

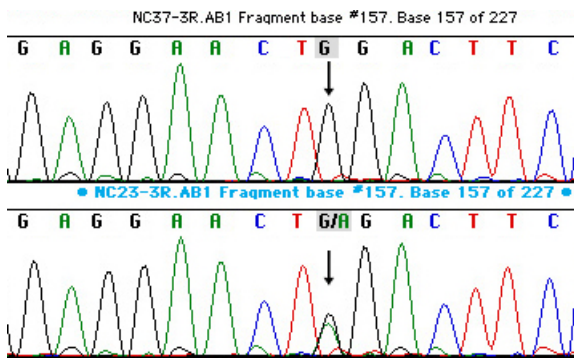


Abbildung 4.15: Vergleichende Darstellung der Elektropherogramme von Exon 3, einmal der Wildtyp (obere Leiste; Patient NC-37) und einmal der SNPs rs12117552 (untere Leiste; NC-23) an Position 612 der cDNA (Pfeil).

Auch in Exon 5 konnte ein bereits bekannter synonymer SNP (rs538089), in homo- und heterozygoter Form, nachgewiesen werden. Die Basenveränderung von T zu C an Position 861 der cDNA (c.861T>C) zieht keine Änderung der AS nach sich, da sowohl GCT als auch GCC für Alanin kodieren (p.Ala287Ala). Insgesamt hat der SNP eine Häufigkeit von 12.01 % in den HCM-Kollektiven und 17.07 % im NC-Kollektiv. Die hetero- sowie die homozygote Form des SNP rs538089 sind in Abbildung 4.16 dargestellt.

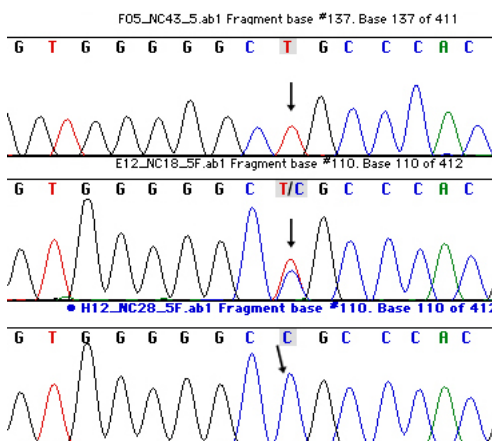


Abbildung 4.16: Elektropherogramme von Exon 5. Vergleich des Wildtyps (obere Leiste; Patient 2536) und des SNP rs538089 in hetero- (mittlere Leiste; Patient 2543) und homozygoter (untere Leiste; Patient NC-28) Form. Die Veränderung der Base an Position 861 der cDNA ist durch einen Pfeil markiert.

Der Vergleich der Elektropherogramme von Exon 6 erbrachte zwei weitere SNPs. Der SNP rs17847242 führt zum Austausch der Base G gegen A (c.1017G>A). Das Wildtyptriplett GCG aus Kodon 339 und das veränderte Triplett GCA kodieren beide für die AS Alanin

(p.Ala339Ala). Der SNP konnte nur bei einem Patienten, 2,44 %, aus dem NC-Kollektiv eruiert werden, welcher in Abbildung 4.17 zu sehen ist.

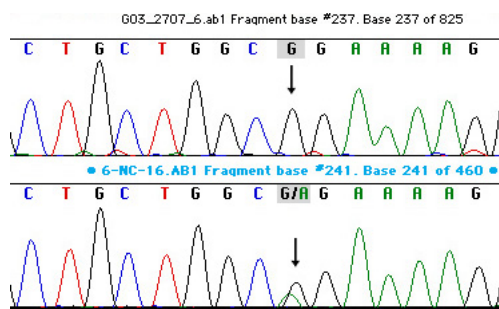


Abbildung 4.17: Gegenüberstellung der Elektropherogramme des SNP rs17847242 (unter Leiste; Patient NC-16) und des Wildtyps (obere Leiste; Patient 2707). Die Pfeile kennzeichnen Position 1017 der cDNA.

Der SNP rs534807 ist eine intronische Variante, die 16 Basen nach Exon 6 lokalisiert ist. Es erfolgt ebenfalls ein Basenaustausch von G zu A (c.1157+16G>A), welcher sowohl hetero-, als auch homozygot sein kann. Die Veränderung einer *splice site* hat dies nicht zur Folge. Alle drei verschiedenen Genotypen zeigt Abbildung 4.18.

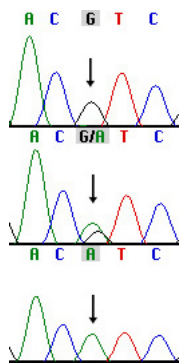


Abbildung 4.18: Intronischer SNP rs534807 (Heterozygote G/A mittlere Leiste; Homozygote A/A untere Leiste) im Vergleich zum Wildtyp (G/G obere Leiste). Die Pfeile markieren Position 16 nach Exon 6.

In Exon 7 wurde der SNP rs505058 identifiziert. Der Basenaustausch an Position 1338 der cDNA hat keinen Einfluss auf das Protein (c.1338T>C), da die Triplets GAT und GAC beide für die saure AS Aspartat kodieren (p.Asp446Asp). Es sind ebenfalls nicht-synonyme Varianten an derselben Stelle bekannt, in der T durch A oder G ersetzt wird und eine AS-Änderung zu Glutamat stattfindet. In der vorliegenden Arbeit konnten jedoch ausschließlich synonyme SNPs nachgewiesen werden. Unter diesen befand sich auch eine Homozygote (Patient 2696 aus K2), die bisher in der Datenbank *dbSNP* nicht aufgeführt wird. Abbildung 4.19 zeigt die verschiedenen DNA-Sequenzen anhand der Elektropherogramme.

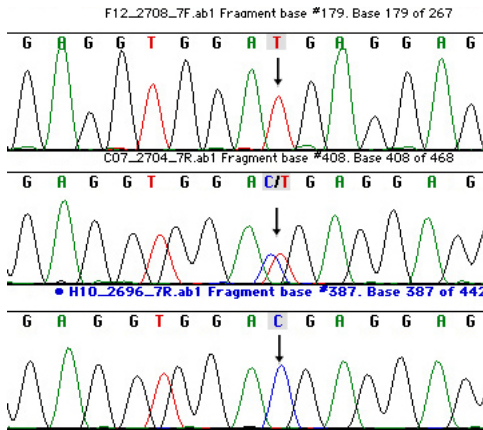


Abbildung 4.19: Ausschnitte der Elektropherogramme von Exon 7. Gegenüberstellung der heterozygoten (mittlere Leiste; Patient 2704) und homozygoten (untere Leiste; Patient 2696) Variante des SNP's rs505058 und des Wildtyps (obere Leiste; Patient 2708) an Position 1338 der cDNA (Pfeil)

Die Auswertung der DNA-Sequenzen von Exon 10, erbrachte den Nachweis des SNP rs4641 in hetero- und homozygoter Form. Durch die Substitution von C durch T an Position 1698 der cDNA im Kodon 566 ändert sich das Basentriplett von CAC zu CAT (c.1698C>T). Beide Triplets kodieren für die positiv geladene AS Histidin (p.His566His). Der SNP rs4641 war in allen Kollektiven der SNP mit der höchsten Frequenz. Hetero- sowie auch homozygote Varianten wurden insgesamt bei 47.13 % der HCM- und bei 56.10 % der NC-Patienten nachgewiesen. Dem gegenüber beträgt die SNP-Häufigkeit der Vergleichspopulation 46.02 %. Eine Gegenüberstellung der verschiedenen Genotypen ist in Abbildung 4.20 gegeben.

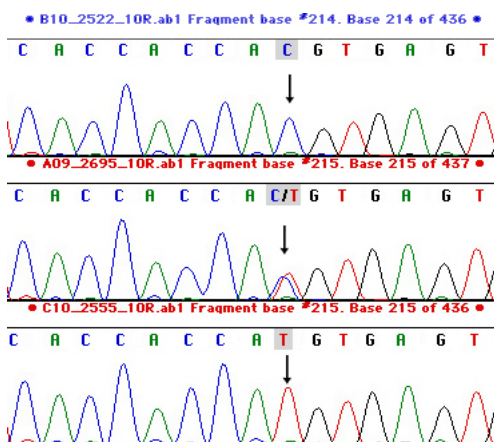


Abbildung 4.20: Sequenzausschnitt der Elektropherogramme einer hetero- (mittlere Leiste; Patient 2695) und einer homozygoten (untere Leiste; Patient 2555) Variante des SNP rs4641 und des Wildtyps (obere Leiste; Patient 2522). Die betroffene Base in Exon 10 ist durch einen Pfeil gekennzeichnet.

Tabelle 21: Vergleich der Genotypenverteilung in den einzelnen Kollektiven mit geeigneten Referenzwerten.

SNP	Veränderung	Kollektiv	Verteilung (%)			Auswertung
			C/C	C/T		
rs11549668	p.Ser17Ser		C/C	C/T		Der Vgl. mit der ESP-Kohorte zeigt sehr ähnliche Verteilungen in K2, K3 und T. In K1 trat der SNP nicht auf.
		K1 (72)	100	0		
		K2 (85)	96.47	3.58		
		T (157)	98.09	1.91		
		K3 (41)	95.12	4.88		
		ESP (2456)	97.60	2.40		
rs41313880	p.Arg119Arg		T/T	G/T		Während der SNP in K1 und K3 nicht vorkam, entsprach die Verteilung in T jener der ESP-Kohorte.
		K1 (72)	100	0		
		K2 (85)	98.82	1.18		
		T (157)	99.36	0.64		
		K3 (41)	100	0		
		ESP (4520)	99.49	0.51		
rs12117552	p.Leu204Leu		G/G	G/A		Seltener SNP mit ähnlicher Verteilung in K2, T und EVP. Im NC-Kollektiv deutlich höhere Frequenz (3/41).
		K1 (72)	100	0		
		K2 (85)	98.82	1.18		
		T (157)	99.36	0.64		
		K3 (41)	92.68	7.32		
		EVP (226)	99.10	0.90		
rs538089	p.Ala287Ala		T/T	T/C	T/C	Ähnliche Verteilung in allen untersuchten Kollektiven. Frequenz in K1 am niedrigsten.
		K1 (72)	91.67	8.33	0	
		K2 (85)	84.71	14.12	1.18	
		T (157)	87.90	11.47	0.64	
		K3 (41)	82.93	14.63	2.44	
rs17847242	p.Ala339Ala		G/G	G/A		Seltener SNP ohne geeignete Referenzwerte. Trat in den untersuchten Kollektiven nur einmal auf.
		K1 (72)	100	0		
		K2 (85)	100	0		
		T (157)	100	0		
		K3 (41)	97.56	2.44		
rs534807	c.1157+16G>A		G/G	G/A	A/A	Ähnliche Verteilung in allen untersuchten Kollektiven. Frequenz in K1 am niedrigsten.
		K1 (72)	91.67	8.33	0	
		K2 (85)	83.53	15.29	1.18	
		T (157)	87.26	12.10	0.64	
		K3 (41)	82.93	14.63	2.44	
rs505058	p.Asp446Asp		T/T	T/C	C/C	SNP mit ähnlicher Verteilung in allen Kollektiven, bis auf eine neu entdeckte homozygote Form.
		K1 (72)	91.67	8.33	0	
		K2 (85)	84.71	14.12	1.18	
		T (157)	87.90	11.47	0.64	
		K3 (41)	82.93	17.07	0	
rs4641	p.His566His		C/C	C/T	T/T	SNP mit der häufigsten Frequenz in allen Kollektiven. Verteilung stets ähnlich der EVP.
		K1 (72)	56.94	36.11	6.94	
		K2 (85)	49.41	42.35	8.42	
		T (157)	52.87	39.49	7.64	
		K3 (41)	43.90	41.46	14.63	
		EVP (226)	53.98	40.71	5.31	

K1 - Kollektiv 1; K2 - Kollektiv 2; K3 - Kollektiv 3; T - HCM-Total; ESP - Amerikanische Population aus dem *Exome Sequencing Project*; EVP - Gesunde Europäische Vergleichspopulation

Die Vergleichswerte des *Exome Sequencing Project (ESP)* und der europäischen Vergleichspopulation (EVP) entstammen der Datenbank dbSNP. Es wird deutlich, dass die Verteilung der Genotypen in den Kollektiven untereinander und im Vergleich mit den Referenzpopulationen überwiegend ähnlich sind. Jedoch ist die Häufigkeit der SNPs rs538089, rs534807 und rs505058 in K1 mit 8.33 % geringer als in K2 und K3 in denen die Gesamthäufigkeit (homo- und heterozygot) zwischen 15.29 und 17.07 % liegt. Der SNP rs41313880 zeigt in K3 (7.32 %) ebenfalls eine höhere Frequenz im Vergleich zur EVP (0.9 %).

4.3.4 Neue *silent*-Varianten

Exon 1 Neben dem im oberen Abschnitt beschriebenen bekannten SNP, wurden in Exon 1 noch zwei weitere unbekannte Varianten gefunden und wie im Abschnitt 4.3.1 beschrieben, bestätigt. Beide sind in den genomischen Datenbanken *ensemble* und *dbSNP* bisher nicht gelistet. Die erste Variante wurde im Kodon 26 verifiziert. Es erfolgt ein Austausch des dritten Nukleotids von C zu T (c.78C>T) in einem Allel. Da sowohl das Wildtyptriplett ATC, als auch das neu entstandene Triplett ATT, für die neutrale AS Isoleucin kodieren, handelt es sich um eine synonyme, nicht-proteinverändernde Variante (p.Ile26Ile). Sie ist in der Linker-Region 1 der α -helikale *rod-domain* lokalisiert. Der Nukleotidaustausch wurde nur bei Patient 1254 (K1) mit einer HCM bestätigt und hat somit eine Häufigkeit von 1.38 % in diesem Kollektiv. Bezogen auf die Gesamtzahl an HCM-Patienten (157) liegt die Häufigkeit bei 0.64 %. Um die Variante c.78C>T mit dem Wildtyp zu vergleichen, präsentiert Abbildung 4.21 Sequenzausschnitte der Elektropherogramme beider Genotypen.

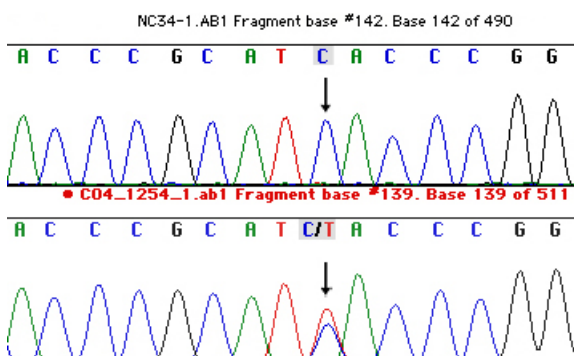


Abbildung 4.21: Vergleichende Darstellung der Elektropherogramme des Wildtyps (obere Leiste; Patient NC-34) und der neu identifizierten Variante c.78C>T (untere Leiste; Patient 1254). Das betroffene Nukleotid an Position 78 der cDNA ist jeweils durch einen Pfeil markiert.

Eine weitere heterozygote Variante konnte an Position drei des Kodons 35 identifiziert werden und befindet sich somit im coil 1B der α -helikalen *rod-domain*. In diesem Kodon wurde be-

reits eine Missense-Mutation an Position eins beschrieben. Die neue Variante entsteht durch Substitution von G durch C (c.105G>C), wodurch es zu einer Tripletänderung von CTG zu CTC kommt. Die hydrophobe AS Leucin wird dadurch nicht beeinflusst (p.Leu35Leu). Auch diese Variante konnte nur bei einem Patienten (NC-34) mit LVNC eruiert werden. Die Häufigkeit in K3 beträgt daher 2.44 %. Die Ergebnisse der Sequenzierung sind in Abbildung 4.22 dargestellt.

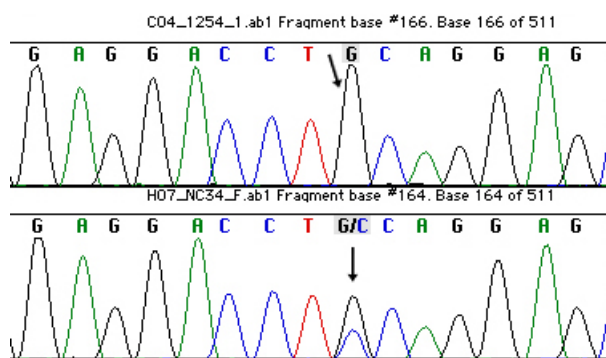


Abbildung 4.22: Ergebnisse der Sequenzierung des Wildtyps (obere Leiste; Patient 1254) im Vergleich zur Variante c.105G>C (untere Leiste; Patient NC-34). Die genaue Lokalisation der Veränderung ist durch einen Pfeil gekennzeichnet.

Exon 11 Nach Festlegung der T_A konnte Exon 11 in allen Proben ohne weitere PCR-Optimierungen erfolgreich amplifiziert werden. Die anschließende Sequenzierung verlief *forward* sowie *reverse* ebenso problemlos. In Probe 1245 konnte eine bisher unbekannt heterozygote Variante nachgewiesen werden. Diese führt zum Nukleotidaustausch von G zu A im Kodon 587 an Position drei (c.1761G>A). Das Kodon kodiert für die *tail-domain* von Lamin A, liegt jedoch außerhalb von Lamin C. Es handelt sich um eine synonyme Variante des Wildtyptripletts CTG, sodass die AS Leucin nicht beeinflusst wird (p.Leu587Leu). Die Häufigkeit beträgt 1.39 % in K1, jedoch unter Berücksichtigung aller HCM-Patienten nur 0.64 %. Abbildung 4.23 zeigt Ausschnitte der Sequenzen des Wildtyps und der Variante c.1761G>A.

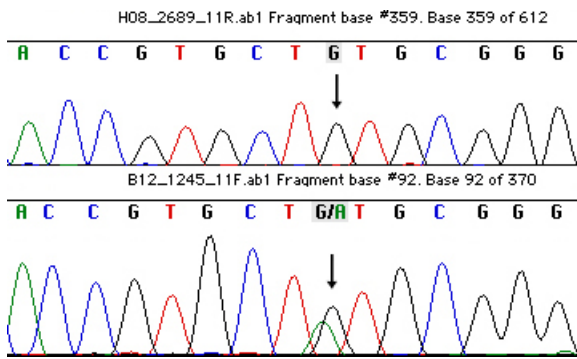


Abbildung 4.23: Gegenüberstellung der Sequenzausschnitte des Wildtyps (obere Leiste; Patient 2689) und der Mutation c.1751G>A (untere Leiste; Patient 1245) im Exon 11. Das betroffene Nukleotid ist durch einen Pfeil gekennzeichnet.

In Exon 11 konnte eine weitere bisher unbekannte heterozygote, synonyme Variante bei einem HCM-Patienten (2689) verifiziert werden. Im letzten Nukleotid von Kodon 601 wurde C durch T substituiert (c.1803C>T). Die daraus entstandene Tripletänderung von AGC zu AGC hat keinen Einfluss auf das Protein, weil beide Kodons für die neutrale AS Serin kodieren (p.Ser601Ser). Die Variante c.1803C>T hat in K2 eine Häufigkeit von 1.18 % (1/85), die jedoch unter Betrachtung aller HCM-Patienten ebenfalls auf 0.64 % (1/157) fällt. In Abbildung 4.24 können Ausschnitte der Elektropherogramme des Wildtyps und der Variante c.1803C>T verglichen werden.

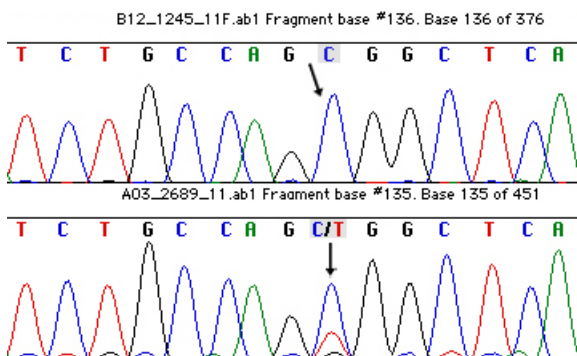


Abbildung 4.24: Sequenzausschnitte des Wildtyps (obere Leiste; Patient 1245) und der Variante c.1803C>T (untere Leiste; Patient 2689). Position 1803 der cDNA ist durch einen Pfeil markiert.

Exon 5 Die saubere Sequenzierung von Exon 5 war in allen Proben möglich. Die Auswertung der Elektropherogramme von Patient 1251 aus K1 zeigte einen bis dahin unbekanntem intronischen Nukleotidaustausch an Position 12 nach dem Exon 5. Die Substitution von C durch T (c.936+12C>T) betraf nur ein Allel, womit es sich um eine heterozygote Variante handelt. In den untersuchten Kollektiven hat die Variante c.936+12C>T dieselbe Häufigkeit wie Variante c.1761G>A aus Exon 11. Sowohl der Wildtyp als auch die neue intronische

Variante sind in Abbildung 4.25 dargestellt.

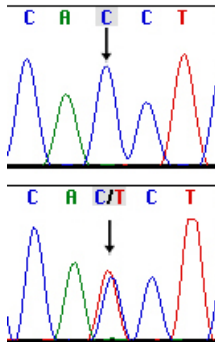


Abbildung 4.25: Ausschnitt der Elektropherogramme des Wildtyps (obere Leiste) gegenüber der intronischen Variante c.936+12C>T (untere Leiste).

Da auch intronische und *silent* Mutationen in seltenen Fällen zu Veränderungen von *splice sites* führen können, wurden alle gefundenen synonymen Varianten mithilfe des Programms RESCUE-ESE auf ihre Auswirkung auf eventuelle *splice sites* untersucht. Bei keiner der verifizierten Varianten konnte eine Änderung festgestellt werden. Abbildung 4.26 zeigt am Beispiel der eruierten Variante c.936+12C>T, dass diese nicht innerhalb einer *splice site* liegt und demnach mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit keinen Einfluss auf die Proteinfunktion hat.

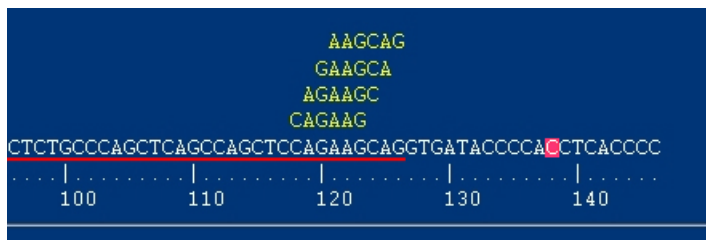


Abbildung 4.26: Darstellung der *splice-sites* (gelb) in der Umgebung der neuen Variante mithilfe des Programms RESCUE-ESE. Alle Basen die zu Exon 5 gehören sind rot unterstrichen. Die betroffene Base aus Variante c.936+12C>T ist rot hinterlegt. Sie führt zu keine Veränderung einer *splice-site*

4.3.5 Neue Missense-Mutationen

Exon 7 Neben dem bereits beschriebenen SNP rs505058 konnte in Exon 7, nach erfolgreicher Sequenzierung mit dem *reverse* Primer, eine neue bisher unbekannte heterozygote Missense-Mutation identifiziert werden. Sie konnte nur bei einem Patienten (1213) aus Kollektiv eins nachgewiesen werden und hat demnach eine Häufigkeit von 1.39 % (1/72). Zur Bestätigung wurde das erste PCR-Produkt in Gegenrichtung sequenziert und zwei neue PCR-Produkte unabhängig voneinander jeweils in *forward* und *reverse* Richtung sequenziert. Die Mutation führt zum Nucleotidaustausch von C zu T an Position 1322 der cDNA

(c.1322C>T), welche an Position zwei im Kodon 441 lokalisiert ist. Die Variante hat demnach Auswirkungen auf Lamin A als auch auf Lamin C. Während GCC für Alanin codiert, codiert CTC für die AS Valin (p.Ala441Val). Zur Differenzierung zwischen einem SNP und einer Mutation wurde die Variante in einer Kontrollgruppe mit 300 herzgesunden Probanden ohne KM mittels RFLP ausgeschlossen (Einzelheiten siehe Abschnitt 4.4). Die Mutation befindet sich in der *Ig-like domain*, einem Teil der *tail-domain*. Diese ist besonders wichtig für die Emerin- und LAP2 α -Bindung von Lamin A/C. Ausschnitte der Elektropherogramme und eine vergleichende Darstellung der Nukleotid- und AS-Sequenz des Wildtyps und der Mutante zeigen Abbildung 4.27 und Tabelle 22.

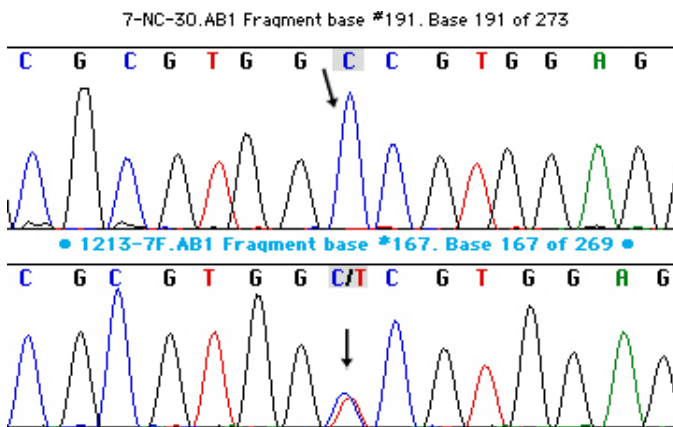


Abbildung 4.27: Sequenzausschnitte der Elektropherogramme des Wildtyps (obere Leiste; Patient NC-30) und der Mutation p.Ala441Val (untere Leiste; Patient 1213). Position zwei des Kodons 441 ist stets grau hinterlegt und durch einen Pfeil markiert.

Tabelle 22: Gegenüberstellung der Nukleotid- und AS-Sequenz des Wildtyps und der Mutante p.Ala441Val. Im Wildtyp ist die betroffene Region grün dargestellt. Im Gegensatz dazu, ist die Veränderung innerhalb der Mutante rot gekennzeichnet.

	Wildtyp					Mutante				
Codon	439	440	441	442	443	439	440	441	442	443
Nukleotidsequenz	CGC	GTG	GCC	GTG	GAG	CGC	GTG	GTC	GTG	GAG
AS-Sequenz	Arg	Val	Ala	Val	Glu	Arg	Val	Val	Val	Glu

Alanin und Valin gehören beide zu den neutralen proteinogenen AS. Einen Vergleich der verschiedenen Strukturformeln und chemischen Eigenschaften geben Abbildung 4.28 und Tabelle 23.

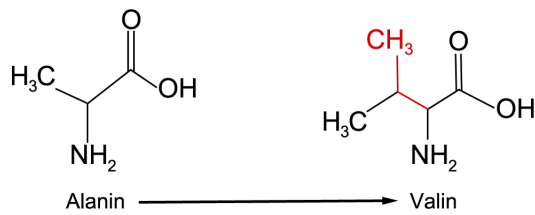


Abbildung 4.28: Vergleich der Strukturformel von Alanin und Valin. Die Veränderung ist rot markiert.

Tabelle 23: Übersicht der wichtigsten chemischen Eigenschaften von Alanin und Valin. Unterschiede sind rot hervorgehoben.

Alanin	Valin
aliphatisch	aliphatisch
hydrophob	hydrophob
neutral	neutral
winzig	klein

Patient 1213 ist ein symptomatischer männlicher Patient mit einer schweren LV-Hypertrophie und reduzierter systolischer Funktion. Die echokardiographischen Daten aus Tabelle 24 wurden im Alter von 72 Jahren eruiert. Zusätzlich leidet er unter verschiedenen HRST, wie ventrikulärer Tachykardie, kompletter Rechtsschenkelblock und negative T-Wellen im EKG. Über den ebenfalls erkrankten Sohn liegen bisher keine Daten vor.

Tabelle 24: Messdaten der Echokardiographie von Patient 1213.

IVS	PWT	LVEDD	LVESD	EF
23 mm	15 mm	46 mm	19 mm	59%

IVS=Dicke des interventrikulären Septums; PWT=Hinterwanddicke; LVEDD=linksventrikulärer enddiastolischer Durchmesser; LVESD=linksventrikulärer endsystolischer Durchmesser; EF=Ejektionsfraktion

Exon 10 In Probe 1274, ebenfalls aus K1, konnte in Exon 10 eine weitere neue Variante nachgewiesen werden. Es handelt sich auch um eine heterozygote Mutation. Diese wurde in gleicher Weise wie Exon 7 bestätigt. An Position 1634 der cDNA wurde G durch A substituiert (c.1634G>A), wodurch es zur Tripletänderung von CGC zu CAC, an Position zwei des Codons 545, kommt. Infolgedessen ändert sich die Wildtyp-AS Arginin und wird durch Histidin ersetzt (p.Arg545His). In Analogie zur neuen Mutation in Exon 7 wurde auch diese neue Variante in einer Kontrollgruppe mit 300 herzgesunden Probanden ohne KM mittels RFLP ausgeschlossen. Es handelt sich demnach um eine Missense-Mutation mit einer Häufigkeit von 1.39 % im analysierten K1 (1/72). Die Mutation befindet sich ebenfalls

in der *Ig-like domain* und hat demnach sowohl mögliche Auswirkungen auf Lamin A als auch auf Lamin C. Abbildung 4.29 veranschaulicht die Ergebnisse der Sequenzierung der Wildtyps und der Mutation. Die jeweilige Nukleotid- und AS-Sequenz sind ergänzend in Tabelle 25 wiedergegeben.

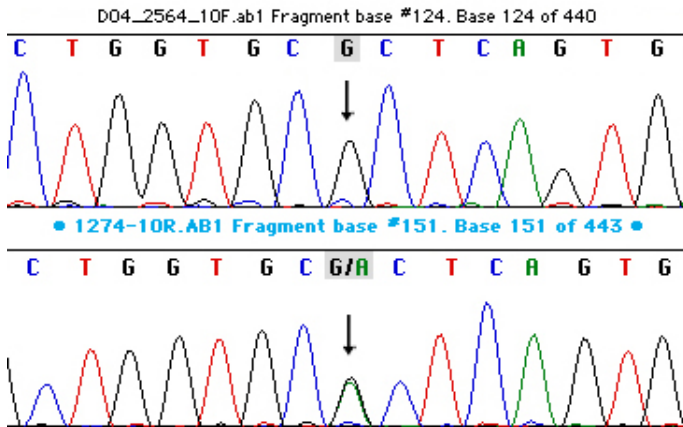


Abbildung 4.29: Ergebnisse der Sequenzierung des Wildtyps (obere Leiste; Probe 2564) gegenüber denen der Mutation c.1634G>A (untere Leiste; Probe 1274). Die genaue Lokalisation an Position zwei des Kodons 545 ist grau hinterlegt und durch einen Pfeil kenntlich gemacht.

Tabelle 25: Übersicht der verschiedenen Nukleotid- und AS-Sequenzen des Wildtyps und der Mutation c.1634G>A. Position zwei im Kodon 545 (blau) und die kodierte AS sind im Wildtyp grün dargestellt, wohingegen die Veränderung in der Mutante rot hervorgehoben wird.

Codon	Wildtyp					Mutante				
	543	544	545	546	547	543	544	545	546	547
Nukleotidsequenz	CTG	GTG	CGC	TCA	GTG	CTG	GTG	CAC	TCA	GTG
AS-Sequenz	Leu	Val	Arg	Ser	Val	Leu	Val	His	Ser	Val

Während die Wildtyp-AS Arginin einen stark basischen Charakter besitzt, ist Histidin nur sehr schwach basisch. Unterschiede bezüglich der Strukturformel der zwei AS werden in Abbildung 4.30 dargestellt. Weitere chemische Eigenschaften sind in Tabelle 26 gegenübergestellt.

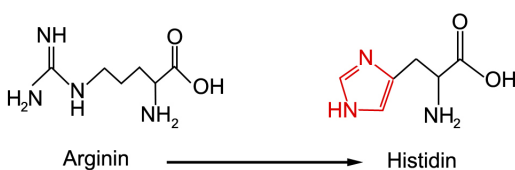


Abbildung 4.30: Strukturvergleich zwischen Arginin und Histidin. Die rote Farbe kennzeichnet den Unterschied zur Wildtyp-AS.

Tabelle 26: Vergleich der chemischen Eigenschaften von Arginin und Histidin. Unterschiede sind rot hervorgehoben.

Arginin	Histidin
aliphatisch	aromatisch
hydrophil (stark)	polar (schwach)
basisch (stark)	basisch (schwach)

Der Patient 1274 besitzt ebenfalls einen typischen HCM-Phänotyp im Echokardiogramm mit einer zusätzlichen Obstruktion des LV-Ausflusstrakts (HOCM). Aufgrund massiver Hypertrophie und körperlicher Einschränkung erhielt der Patient 1996 bereits eine Myektomie, so dass alle echokardiographischen Daten aus Tabelle 27 postoperativ sind. Zum Zeitpunkt der Untersuchung war der Patient 67 Jahre alt. Des Weiteren zeigten sich im EKG verschiedene Störungen des kardialen Reizleitungssystems, wie z.B. ein inkompletter Rechtsschenkelblock oder T-Negativierungen.

Tabelle 27: Echokardiographische Daten von Patient 1274.

IVS	PWT	LVEDD	LVESD	EF
14 mm	12 mm	44 mm	29 mm	34%

IVS=Dicke des interventrikulären Septums; PWT=Hinterwanddicke; LVEDD=linksventrikulärer enddiastolischer Durchmesser; LVESD=linksventrikulärer endsystolischer Durchmesser; EF=Ejektionsfraktion

4.4 Ergebnisse der RFLP

Exon 7 Um zwischen einem SNP und einer Mutation zu differenzieren, wurde für jede nicht-synonyme Variante eine Kontrollgruppe, bestehend aus 300 gesunden Probanden ohne HCM und mit normaler Herzgröße und -funktion, durch einen RFLP auf das Vorhandensein der Variante untersucht. Mithilfe des Computerprogramms SEQUENCHER 4.1 wurde für die Mutation p.Ala441Val und den Wildtyp eine Übersicht über die verschiedenen Restriktionschnittstellen, eine *cutmap*, erstellt. Wie in Abbildung 4.31 sichtbar wird, geht durch die Mutation p.Ala441Val jeweils eine Schnittstelle der Restriktionsenzyme Dsa I, Hae III und Pae I verloren.

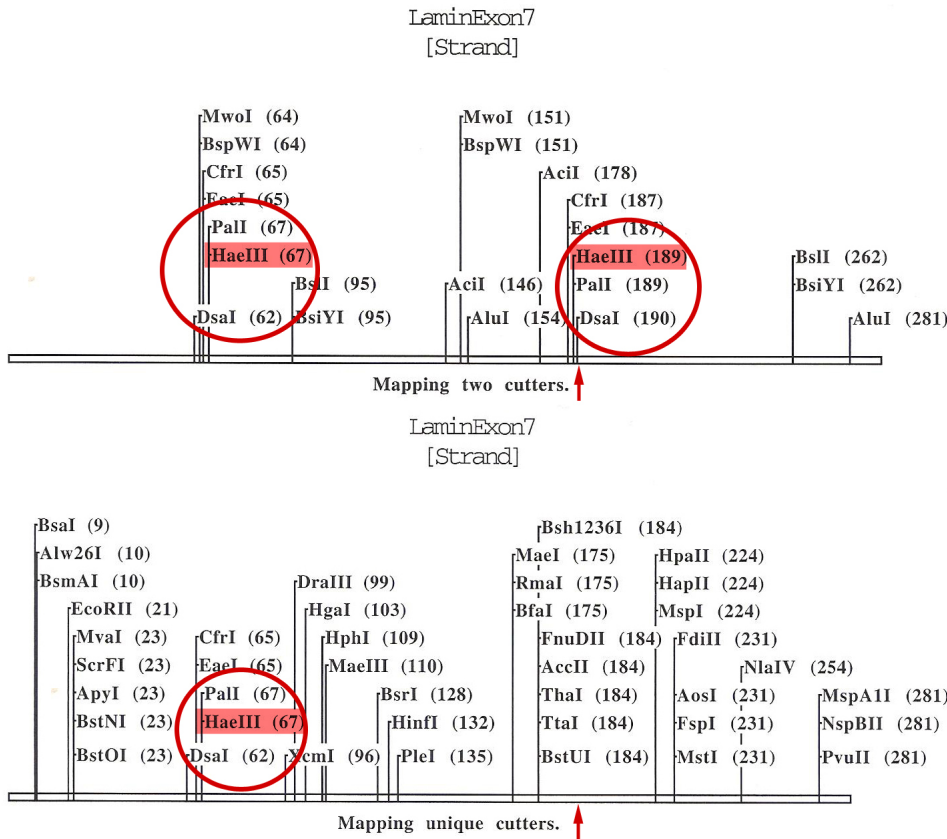


Abbildung 4.31: Gegenüberstellung der *two cut* Restriktionsenzyme des Wildtyps (obere Abbildung) und der *unique cutters* der Mutation p.Ala441Val (untere Abbildung). Der rote Kreis kennzeichnet die drei Restriktionsenzyme, die im Wildtyp zwei Schnittstellen besitzen, in der Mutante jedoch nur eine. Das verwendete Enzym für den RFLP ist rot hervorgehoben. Der Pfeil markiert die Position der Mutation (Position 190 im Exon 7).

Mutation p.Ala441Val ist an Position 190 des 292 bp großen PCR-Produkts von Exon 7 lokalisiert. Für den Verdau wurde das Restriktionsenzym Hae III verwendet, da es im Labor vorrätig war. Das Enzym wurde aus einem *E. coli*-Stamm, der ein geklonetes Hae III Gen des Bakteriums *Haemophilus aegypticus* trägt, isoliert. Im Wildtyp hat Hae III zwei Schnittstellen: an Position 67 und 189 des PCR-Produkts. Durch die Mutation p.Ala441Val geht die zweite Schnittstelle verloren (Position 189), sodass es nur noch einmal schneidet. Die Erkennungsequenz von Hae III ist:



Während im Wildtyp drei Fragmente mit einer Größe von 67, 122 und 103 bp entstehen, gibt es in der Mutation p.Ala441Val aufgrund des Verlustes einer Restriktionsschnittstelle

nur zwei Fragmente der Größe 67 und 225 bp. Da es sich bei der gefunden Mutation jedoch um eine Heterozygote handelt, findet sich im zugehörigen verdauten PCR-Produkt ein gesundes und ein mutiertes Allel. Die Resultate zeigt Abbildung 4.32.

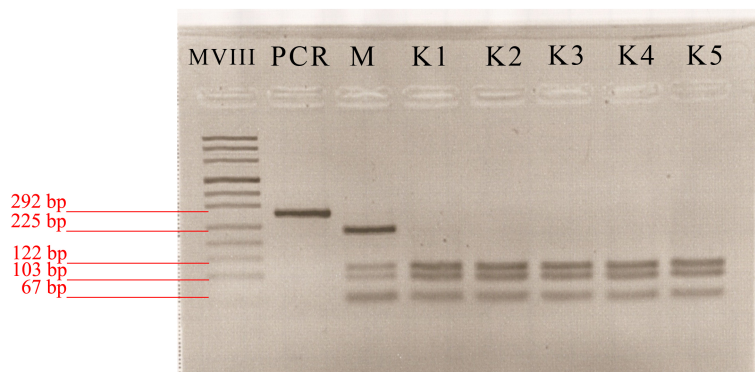


Abbildung 4.32: 3 %iges Agarosegel mit den Ergebnissen des Restriktionsverdaus. Während der Wildtyp zwei Restriktionsschnittstellen hat, liegt bei der Mutation eine Wildtypallele (zwei Schnittstellen) und ein mutiertes Allel (eine Schnittstelle) vor. MVIII-Molekulargewichtsmarker, PCR-unverdautes PCR-Produkt, M-Mutation, WT-Wildtyp.

Die Variante c.1322C>T konnte in keiner der 300 Kontrollproben nachgewiesen werden. Demnach handelt es sich um eine Missense-Mutation.

Exon 10 Analog zu Exon 7 wurde die Mutation p.Arg545His aus Exon 10 auch mithilfe eines RFLP in einer Kontrollgruppe herzgesunder Probanden ausgeschlossen. Hierzu wurde erneut mit dem Computerprogramm SEQUENCHER 4.1 eine *cutmap* der Restriktionsenzyme für das 459 bp große PCR-Produkt erstellt. Durch die Variante c.1634G>A entsteht im Kodon 545 eine neue Schnittstelle für die Restriktionsenzyme Alw21 I, BsiHKA I und HgiA I. Abbildung 4.33 zeigt die *cutmap* aller *unique cutters* der Mutation p.Arg545His, einschließlich der drei neu entstandenen Restriktionsschnittstellen.

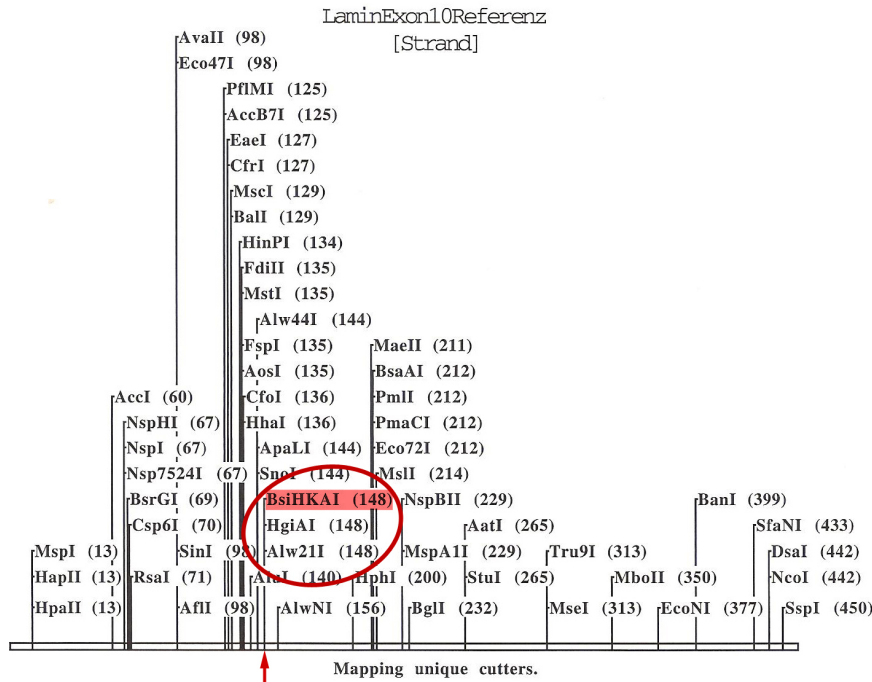
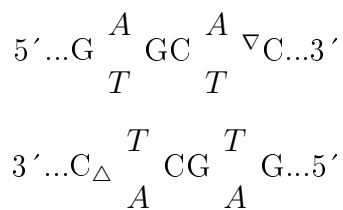


Abbildung 4.33: *Cutmap* der *unique cutters* von Exon 10 nach Veränderung durch die Mutation c.1634G>A. Neu entstandene Restriktionsschnittstellen im betroffenen Codon sind rot eingekreist. Das verwendete Enzym ist rot hinterlegt. Der rote Pfeil markiert die Position (148) der Mutation im PCR-Produkt von Exon 10.

BsiHKA I stand im Labor bereits zur Verfügung und wurde deshalb für den Restriktionver-
dau verwendet. Das Enzym wird aus dem *Bacillus stearothermophilus* isoliert. Es spaltet an
Position 148 des PCR-Produkts an folgenden Erkennungssequenzen:



Während der Wildtyp keine Schnittstelle für das Enzym BsiHKA I besitzt, also nur ein
Fragment besitzt, wird die Variante durch die Schnittstelle an Position 148 in zwei Fragmente
mit einer Größe von 148 und 311 bp gespalten. Unter allen 300 Kontrollproben befand sich
keine weitere Mutation p.Arg545His. Aus diesem Grund liegt die Annahme nahe, dass es sich
auch hier um eine Missense-Mutation handelt. Die Ergebnisse der Gelelektrophorese zeigt
Abbildung 4.34.

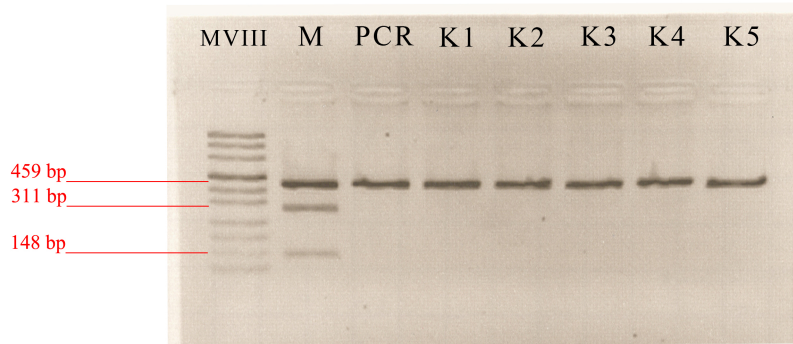


Abbildung 4.34: Ergebnisse des RFLP zwischen dem Wildtyp und der Mutation p.Arg545His. Die Größen der einzelnen Banden sind rot beschriftet. Deutlich erkennbar ist, dass durch die Mutation in einem Allel eine neue Restriktionsschnittstelle entsteht. MVIII-Molekulargewichtsmarker, PCR-unverdautes PCR-Produkt, M-Mutation, WT-Wildtyp.

4.5 Zusammenfassung der Ergebnisse

Zur Veranschaulichung der Ergebnisse zeigt Abbildung 4.35 die Lokalisation aller gefundenen Varianten im LMNA Gen und für die nicht-synonymen Varianten zusätzlich deren Lokalisation innerhalb der Proteine Lamin A/C. Als Übersicht über alle gefundenen Varianten, einschließlich ihrer Klassifikation, internationalen Referenznummer, Lokalisation und genomischer Veränderung, dient Tabelle 28.

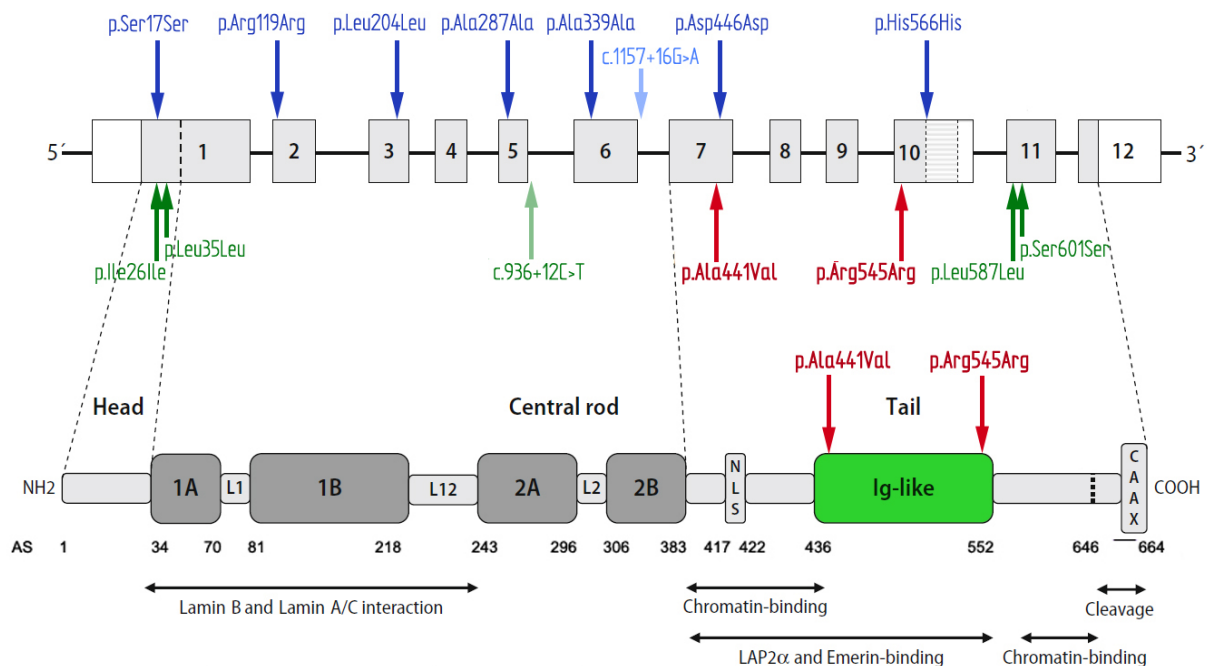


Abbildung 4.35: Darstellung der gefundenen Varianten im LMNA Gen. Bekannte synonyme SNPs sind blau, neue synonyme Varianten grün und neu identifizierte Missens-Mutationen sind rot dargestellt. Nicht-synonyme Varianten sind zusätzlich innerhalb Proteinstruktur markiert.

Tabelle 28: Tabellarische Übersicht über gefundene SNPs und Mutationen.

Variante	Referenznummer	n	Exon	cDNA-Änderung	Triplet-änderung	AS-Austausch
Missense-Mutation	neu	1/72 (K1)	7	c.1322C>T	GCC/GTC	p.Ala441Val
Missense-Mutation	neu	1/72 (K1)	10	c.1634G>A	CGC/CAC	p.Arg545His
Syn. Variante	neu	1/72 (K1)	1	c.78C>T	ATC/ATT	p.Ile26Ile
Syn. Variante	neu	1/41 (K3)	1	c.105G>C	CTG/CTC	p.Leu35Leu
Syn. Variante	neu	1/72 (K1)	11	c.1761G>A	CTG/CTA	p.Leu587Leu
Syn. Variante	neu	1/85 (K2)	11	c.1803C>T	AGC/AGT	p.Ser601Ser
Syn. Variante	neu	1/72 (K1)	5-6	c.936+12C>T	C/T	
Syn. SNP	rs11549668	3/85 (K2) 2/41 (K3)	1	c.51C>T	AGC/AGT	p.Ser17Ser
Syn. SNP	rs41313880	1/85 (K2)	2	c.357C>T	CGC/CGT	p.Arg119Arg
Syn. SNP	rs12117552	1/85 (K2) 3/41 (K3)	3	c.612G>A	CTG/CTA	p.Leu204Leu
Syn. SNP	rs538089	6/72 (K1) 13/85 (K2) 7/41 (K3)	5	c.861T>C	GCT/GCC	p.Ala287Ala
Syn. SNP	rs17847242	1/41 (K3)	6	c.1017G>A	GCG/GCA	p.Ala339Ala
Syn. SNP	rs505058	6/72 (K1) 13/85 (K2) 7/41 (K3)	7	c.1338T>C	GAT/GAC	p.Asp446Asp
Syn. SNP	rs4641	31/72 (K1) 43/85 (K2) 23/41 (K3)	10	c.1698C>T	CAC/CAT	p.His566His
Intron. SNP	rs534807	6/72 (K1) 14/85 (K2) 7/41 (K3)	6-7	c.1157+16G>A	G/A	

5 Diskussion

5.1 Überblick

Zielsetzung der vorliegenden Arbeit war die genetische Analyse des Gens LMNA, einem der wichtigsten Krankheitsgene der fDCM, bei Patienten mit HCM und bei Patienten mit LVNC. Alle zwölf kodierenden Exons konnten in allen Patienten amplifiziert, sequenziert und auf genetische Varianten untersucht werden. Sowohl bei den HCM- als auch bei den NC-Patienten konnten sieben bereits bekannte SNPs nachgewiesen werden. In den HCM-Kollektiven konnten zudem vier und im NC-Kollektiv eine neue synonyme Variante bestätigt werden. Weiterhin konnten bei zwei nichtverwandten an HCM erkrankten Patienten zwei bis dato unbekannte Missense-Mutationen identifiziert werden.

Im Folgenden soll auf die möglichen genetischen Auswirkungen der gefundenen Varianten und deren Bedeutung hinsichtlich der Pathogenese der KM eingegangen werden.

5.2 Methoden

Die verwendeten Methoden, PCR, Agarosegelelektrophorese, Sequenzierung mithilfe der Dye-Terminator-Methode und Restriktionsenzym-Verdau, gehören zu den Standardmethoden der genetischen Forschung. Alle waren bereits im Labor etabliert. Zu Beginn meiner Arbeit stand die Überprüfung und Optimierung bereits vorhandener Primerpaare und die Etablierung neuer Primerpaare. Exon 3 und Exon 8 waren schwer zu vervielfältigen, wodurch die Agarosegelelektrophorese stets schwache Banden zeigte. Deswegen wurde der PCR-Ansatz in beiden Fällen mit dem Aditivum Betain versehen. Exon 1 war aufgrund seiner Größe (356 bp) und des hohen GC-Gehalts (66.85 %) ebenfalls schwer zu vervielfältigen. Aus diesem Grund kam eine *Touchdown*-PCR zum Einsatz. Während die Standard-PCR-Bedingungen bei keiner Temperatur ein spezifisches Produkt der gewünschten Größe (532 bp) zeigten, führte die *Touchdown*-PCR bei allen Proben zum gewünschten Ergebnis (Abb. 4.10). Nach Abschluss der Optimierungen konnten in allen Proben alle zwölf kodierenden Exons von LMNA vervielfältigt werden. Die fehlende 3'-5'-Exonukleaseaktivität der Taq-Polymerase ist ein Schwachpunkt der PCR und führt im Durchschnitt alle 9000 Basen zu einem falsch eingebaute Nukleotid das nicht korrigiert wird [Brown 2007]. Die Fehlerrate steigt exponentiell durch die als Matrize dienenden synthetisierten Stränge, weswegen eine Bestätigung gefundener Varianten nötig war.

Für die Sequenzierung nach der Dye-Terminator-Methode wurde der ABI Prism 3100-Avant Genetic Analyzer der Firma Applied Biosystems genutzt. Dieser zeigte in Studien eine Genauigkeit von 99.91 % [Eshleman 2005]. Mit ihm war es möglich die zwölf Exon, bis auf Exon 9, in allen Proben ohne größere Probleme zu sequenzieren. Aufgrund des geringen Abstandes sowohl des *forward* als auch des *reverse* Primers und der daraus resultierenden Unsauberkeit der jeweils ersten Basen, mussten für Exon 9 alle Proben in beide Richtungen sequenziert und gegeneinander verglichen werden. Durch die zweimalige Wiederholung aller Versuche zur Bestätigung gefundener Varianten sind Fehler nahezu ausgeschlossen. Der Restriktionsenzym-Verdau konnte mit Erfolg für die gefundenen nicht-synonymen Mutationen etabliert werden. Proben die nicht eindeutig interpretiert werden konnten, wurden erneut mittels Sequenzierung überprüft.

5.3 Polymorphismen und ihr Einfluss auf den Phänotyp

Ein SNP ist die häufigste Variation der genomischen DNA, welche zu Veränderungen einzelner Nukleotide führt. Variation heißt, es gibt keine Standardsequenz, sondern verschiedene Varianten. Im Unterschied zur Mutation liegt die Häufigkeit der Genvariante bei $\geq 1\%$ [Twyman 2003]. SNPs sind von großer Bedeutung für die Evolution und bieten teilweise einen entscheidenden Selektionsvorteil. Sie sind nur selten alleinige Ursache einer Erkrankung, doch können sie helfen neue Krankheitsgene zu identifizieren, z.B. wenn ein SNP positiv mit dem Auftreten einer bestimmten Erkrankung korreliert [Twyman 2003]. Auch für individuelle Ausprägungen der untersuchten KM spielen Polymorphismen eine große Rolle [Keren 2008]. Wie andere Herzerkrankungen, ist auch der kardiale Phänotyp der KM das Ergebnis eines komplexen genetischen Zusammenspiels und verschiedener Umwelteinflüsse. Wie aus Abschnitt 4.3.3 entnommen werden kann, wurden in den untersuchten Kollektiven ausschließlich bekannte synonyme SNPs gefunden, die keinen Einfluss auf die Proteinfunktion haben. Alle SNPs wurden zusätzlich mit dem Programm RESCUE-ESE auf die Veränderung eventueller *splice-sites* untersucht, welche sich ebenfalls als negativ herausstellten. Ein Zusammenhang zwischen diesen acht SNPs und der Pathogenese der HCM oder LVNC ist demnach sehr unwahrscheinlich. Für die SNPs pSer17Ser (Exon 1), p.Arg119Arg (Exon 2), p.Leu204Leu (Exon 3) und p.His566His (Exon 10) standen in der Datenbank *dbSNP* geeignete Kollektive zum Vergleich der Frequenzen der einzelnen Genotypen zur Verfügung. Aus der Zusammenfassung in Tabelle 21 ist ersichtlich, dass die Verteilung bis auf den SNP

rs12117552 (Exon 3), sehr ähnlich der Verteilung in der *ESP*-Kohorte und der EVP ist. In K3 ist der SNP mit 7.32 % jedoch wesentlich häufiger als in der EVP (0.09 %). Diese und andere Unterschiede in der Häufigkeit der einzelnen Genotypen ist auf den Bias der geringen Patientenzahl in den einzelnen Kollektiven zurückzuführen. Der Nachweis bereits bekannter genetischer Varianten spricht hingegen für die Sensitivität der verwendeten Methoden und für die Qualität und Sauberkeit ihrer Durchführung.

5.4 Neue synonyme Varianten

In den HCM-Kollektiven konnten insgesamt vier neue heterozygote synonyme Varianten identifiziert werden. Die Variante p.Ile26Ile aus Exon 1 ist in der *head domain* von LMNA lokalisiert, während sich die Varianten p.Leu587Leu und p.Ser601Ser aus Exon 11 in der *tail domain* befinden. Im nicht-kodierenden intronischen Bereich zwischen Exon 5 und 6 wurde Variante c.936+12C>T nachgewiesen. Unter den NC-Patienten konnte Variante p.Leu35Leu im Exon 1 im Bereich der zentralen *rod domain* eruiert werden. Jede Variante wurde nur einmal gefunden. Aufgrund der Zufallsverteilung einer Variante kann keine Aussage über die Häufigkeit getroffen werden. Da die Varianten keinen Einfluss auf die kodierten AS haben, sollen deren Eigenschaften ebenso wie die Funktion der betroffenen Domäne nicht näher erläutert werden. Zudem wurde eine Veränderung bestehender splice-sites ausgeschlossen. Demnach sind Einflüsse auf die Proteinfunktion und damit ein Zusammenhang zwischen diesen Varianten und der Pathogene der HCM oder LVNC nahezu ausgeschlossen. Aus diesem Grund wurde von weiteren Untersuchungen abgesehen. Es ist anzunehmen, dass es sich um seltene SNPs handelt.

5.5 Fehlende Mutationsnachweise bei Patienten mit LVNC

Im untersuchten NC-Kollektiv konnten neben den bereits beschriebenen bekannten und unbekanntem SNPs keine krankheitsverursachenden Mutationen nachgewiesen werden. Dies ist sowohl durch die geringe Anzahl an Probanden als auch durch die extreme genetische Heterogenität der LVNC bedingt. Um so wichtiger ist die weitere genetische Erforschung der Erkrankung und die Untersuchung größerer Kohorten, um Rückschlüsse auf die Pathogenese zu ziehen. Grundvoraussetzung dafür ist die Schaffung einheitlicher diagnostischer Richtlinien.

5.6 Auswirkungen der Missense-Mutationen auf genetischer Ebene

Für den Einfluss der identifizierten Missense-Mutationen auf die Funktion von Lamin A/C und den Phänotyp sind die chemischen Eigenschaften der verschiedenen AS von essentieller Bedeutung. Mutation p.Ala441Val in Exon 7 führt zur AS-Veränderung von Alanin zu Valin. Beide AS gehören zur Gruppe der ungeladenen AS und haben ähnliche chemische Eigenschaften (siehe Tabelle 23). Obwohl es sich bei diesen AS um hydrophobe AS handelt, liegt der Hydrophobizitätsindex von Valin (4.2) wesentlich höher als der von Alanin (1.8) [Kyte 1982]. Diese Beeinflussung der hydrophoben Wechselwirkungen und der Größenunterschied der zwei AS haben unmittelbaren Einfluss auf die Proteinkonfiguration. Während Alanin in einem Protein die Ausbildung von α -helikalen Strukturen fördert, führt Valin eher zur Ausbildung von β -Faltblattstrukturen [FIZ CHEMIE 2011]. Die Proteinkonfiguration wiederum ist in hohem Maße wichtig für die spezifische Proteinfunktion.

Die Mutation p.Arg545His in Exon 10 hat den Austausch der AS Arginin gegen Histidin zur Folge. Trotz der basischen Eigenschaften beider AS, gibt es wichtige Unterschiede. Arginin ist durch seine Restgruppe ($pK_s = 12.48$ [FIZ CHEMIE 2011]) die am stärksten positiv geladene AS. Im Gegensatz dazu ist Histidin durch seinen Imidazolring ($pK_s = 5,95$) als einzige AS bei physiologischem pH in der Lage sowohl Protonen aufzunehmen als auch abzugeben. Sie besitzt somit wichtige Puffereigenschaften und übernimmt katalytische Funktionen bei Enzymreaktionen. Die spezifische Ladung der AS hat unmittelbare Auswirkungen auf die Funktion des Proteins. Die AS-Änderung von Arginin zu Histidin kann möglicherweise die Bindungseigenschaften von Lamin A/C an andere Proteine beeinflussen. Diese Bindungen haben wiederum großen Einfluss auf die spezifischen Funktionen von Lamin A/C, wie z.B. die Stabilisierung des Zellkerns und Zytoskeletts und die Verankerung von Transmembranproteinen.

Die Veränderung der chemischen Eigenschaften und deren mögliche Folgen sprechen dafür, dass es sich bei den gefundenen Varianten p.Ala441Val und p.Arg545His um krankheitsverursachende Mutationen handelt.

Eine weitere Möglichkeit, Rückschlüsse darüber zu ziehen, ob es sich bei den gefundenen nicht-synonymen Varianten um SNPs oder Mutationen handelt, ist der Vergleich der AS-Abfolge der betroffenen Region mit anderen Spezies, wie er in Abbildung 5.1 dargestellt ist. Zudem ermöglicht es Schlussfolgerungen über den Erhalt der AS während der Evolution und deren Bedeutung.

Während die durch Kodon 441 kodierte AS Alanin in allen Säugetieren hochkonserviert ist, zeigen der Zebrafisch und die Stechmücke evolutionsbedingte Veränderungen. Diese entsprechen jedoch nicht den mutationsbedingten Änderungen. Arginin, welches durch Kodon 545 kodiert wird, ist nicht nur in Säugetieren, sondern auch in anderen Spezies hochkonserviert. Doch nicht nur die betroffenen AS sind hochkonserviert, sondern auch die jeweiligen umgebenden Regionen. Es handelt sich demnach um orthologe Sequenzen.

Kodon	441	545
Mutation	RV V VE	LV H SV
H. sapiens	RV A VE	LV R SV
P. troglodytes (Schimpanse)	RV A VE	LV R SV
C. lupus (Wolf)	RV A VE	LV R SV
B. taurus (Rind)	RV A VE	LV R SV
M. musculus (Maus)	RV A VE	LV R S L
R. norvegicus (Wanderratte)	RV A VE	LV R S L
D. rerio (Zebrafisch)	RV T VD	VT R S L
A. gambiae (Stechmücke)	D I E VD	R H R M M

Abbildung 5.1: Homologievergleich. Vergleich der AS-Sequenzen verschiedener Spezies für die Mutationen p.Ala441Val und p.Arg545His und deren Umgebung [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/HomoloGene/HGDownload.cgi?hid=41321>].

Die Homologie der betroffenen Kodons und ihrer Umgebung lassen auf eine funktionelle Relevanz der AS und eine bedeutsame Rolle im Laufe der Evolution schließen. Weiterhin unterstützt es die Annahme, dass es sich bei den gefundenen nicht-synonymen Varianten p.Ala441Val und p.Arg545His um krankheitsverursachende Mutationen handelt.

Die betroffenen Kodons 441 und 545 befinden sich beide in der hochkonservierten *Ig-like domain*, einem Abschnitt der COOH-terminalen *tail-domain*. Die *Ig-like domain* ist an der Bindung von Lamin A/C an andere Proteine, wie LAP2 α und Emerin, und die DNA beteiligt [Broers 2006, Krimm 2002, Perrot 2009]. Da Lamin A/C in erster Linie ein Protein der Kernhülle ist, können Änderungen der Proteinkonfiguration zur Schwächung der Kernlamina und damit zu Störungen der Integrität und Stabilität des Zellkerns führen. Dies erhöht wiederum die Anfälligkeit der Zelle für mechanischen Stress, z.B. Muskelkontraktionen. Wie aus Abbildung 1.9 entnommen werden kann, bestehen zahlreiche Interaktionen dieser Proteine mit anderen Proteinen, die regulatorische und stützende Funktionen haben. Eine Veränderung der Bindungsverhältnisse der *Ig-like domain* könnte demnach über die Beeinflussung des

Rb, des *Barrier autointegrations factors (BAF)* und anderer TF eine Veränderung verschiedener Differenzierungsvorgänge nach sich ziehen. Durch die Interaktion mit Proteinen des Zytoskeletts, beispielsweise Aktin, kann eine Veränderung der Emerinbindung möglicherweise Einschränkungen der Zellstabilität zur Folge haben. Inwiefern Veränderungen der Bindung zu LAP2 α zur Beeinflussung des Chromatins und dadurch zu Veränderung im Replikations- oder Transkriptionszyklus führen, ist unklar.

Die *Ig-like domain* umfasst insgesamt 116 AS. Diese formen neun einzelne β -Stränge, die sich zu zwei β -Faltblattstrukturen organisieren. Innerhalb des Moleküls gibt es einen hydrophoben Kern, der wichtig für die Stabilisierung der β -Faltblattstruktur ist. Der hydrophobe Kern wird durch 24 AS gebildet zu denen auch die AS Val440 und Val442 gehören, wie Abbildung 5.2 verdeutlicht [Krimm 2002].

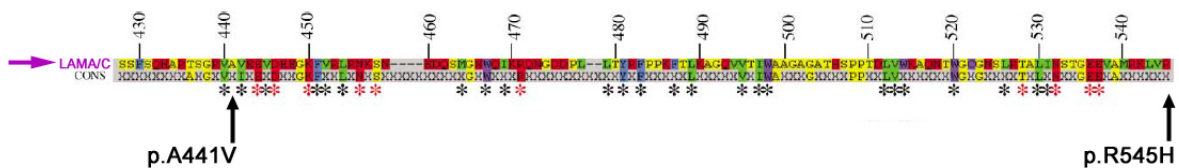


Abbildung 5.2: *C-terminal domain* von Lamin A/C im Vergleich mit der *C-terminal domain* von anderen IF. Deutlich erkennbar, liegt die identifizierte Mutation p.A441V zwischen zwei hochkonservierten hydrophoben AS. Durch die Mutation wird das Kodon 441 selbst hydrophob und beeinflusst somit den hochkonservierten hydrophoben Bereich. Mutation p.R545H liegt außerhalb des hochkonservierten Bereichs. CONS - Zusammenfassung der AS die in den untersuchten IF eine Konservierung $\geq 60\%$ haben. Schwarze Sterne - hochkonservierte hydrophobe AS, rote Sterne - hochkonservierte polare AS. Modifiziert nach [Krimm 2002].

Das betroffene Kodon 441 liegt genau zwischen diesen AS (Val440 und Val442), ist in der Wildtypform jedoch nicht selbst an der Bildung des hydrophoben Kerns beteiligt. Die durch die Mutation p.Ala441Val entstandene AS Valin könnte jedoch durch ihren stark hydrophoben Charakter zur Destabilisierung der Konfiguration der Proteindomäne und dadurch zu Funktionsänderungen führen. Das betroffene Kodon 545 ist weder an der Bildung des hydrophoben Kerns der Domäne beteiligt noch gehört es zu den konservierten polaren AS an der Oberfläche der Domäne, welche wichtig für die Stabilisierung der Sekundärstruktur der *Ig-like domain* ist [Dhe-Paganon 2002, Krimm 2002].

5.7 Mögliche Auswirkungen auf die Pathogenese der HCM

Bei den in der vorliegenden Arbeit identifizierten Missense-Mutationen p.Ala441Val und p.Arg545His handelt es sich um die ersten LMNA-Mutationen bei Patienten mit isolierter HCM. Üblicherweise wird HCM durch Mutationen in verschiedenen Genen verursacht, die für Sarkomerproteine kodieren. LMNA stellt demnach das erste HCM-assoziierte Gen dar, das für ein Intermediärfilamentprotein kodiert. Da bisher mehr als 20 verschiedene HCM-assoziierte Gene identifiziert wurden, ist es sehr wahrscheinlich, dass die Zahl in Zukunft noch steigen wird. Im untersuchten Kollektiv 1 liegt die Prävalenz der LMNA-Mutationen bei 2,78 %. Die Prävalenz unterliegt jedoch dem Selektionsbias des Patientengutes, da bei allen Patienten aus Kollektiv 1 im Vorfeld Mutationen in den üblichen HCM-Genen (siehe Tabelle 29) ausgeschlossen wurden. Im Hinblick auf die Gesamtzahl der untersuchten HCM-Patienten beträgt die Prävalenz 1,27 %. Da Mutationen sehr selten sind und einer Zufallsverteilung unterliegen, lässt sich jedoch keine Aussage über die Häufigkeit der Mutationen p.Ala441Val und p.Arg545His bei Patienten mit HCM treffen.

Die LMNA-positiven Patienten zeigen beide den typischen Phänotyp der HCM mit einer schweren linksventrikulären Hypertrophie und eingeschränkter systolischer Funktion (Details siehe Tabelle 24 und 27). Patient 1213 mit der Mutation p.Ala441Val hat zudem einen an HCM erkrankten Sohn. Obwohl dieser bisher leider nicht für weiterführende genetische Untersuchungen zur Verfügung stand, weist es auf einen autosomal-dominanten Erbgang hin, welcher sowohl für die LMNA-assoziierte KM als auch für HCM im Allgemeinen typisch ist. Die Erkrankung zeichnet sich bei Patient 1274 mit der Mutation p.Arg545His durch einen schweren Verlauf mit zusätzlicher Obstruktion des linksventrikulären Ausflusstraktes aus (HOCM), welche im Jahr 1996 die Indikation zur Myektomie stellte. Aggressive Krankheitsverläufe sind ein weiteres typisches Merkmal der LMNA-assoziierten KM [Lu 2011]. Von besonderem Interesse ist die Tatsache, dass sowohl Patient 1274 als auch Patient 1213 unter verschiedenen Formen von Arrhythmien leiden. HRST, wie Vorhofflimmern, AV-Blöcke und ventrikuläre Arrhythmien sind ein wichtiges spezifisches und klinisches Merkmal der LMNA-assoziierten DCM. Belegt wird dieser Zusammenhang unter anderen durch die Ergebnisse von Perrot et al. In einem iDCM-Kollektiv trugen 7 % eine LMNA-Mutation, wobei jeder Mutationsträger unter mindestens einer HRST litt [Perrot 2009]. In einem fDCM-Kollektiv, in dem jeder Patient einen AV-Block II oder III Grades hatte, konnte bei 80 % eine LMNA-Mutation nachgewiesen werden [Saga 2009]. Auch haploinsuffiziente LMNA +/- Mäuse zei-

gen eine DCM in Kombination mit kardialen Arrhythmien, durch Apoptose von Kardiomyozyten des AV-Knotens [Wolf 2008]. Diese und andere Ergebnisse sprechen für einen kausalen Zusammenhang zwischen LMNA-bedingter fDCM und HRST. Muchir et al zeigten im Jahr 2000 das auch die LMNA-bedingte LGMD, eine weitere Erkrankung des quergestreiften Muskels, mit HRST assoziiert ist [Muchir 2000]. Ob HRST ebenfalls ein spezifisches Merkmal der LMNA-assoziierten HCM sind, ist durch die Untersuchung größerer Kohorten zu klären. Diese Ergebnisse weisen jedoch darauf hin, dass es sich bei den identifizierten Varianten p.Ala441Val und p.Arg545His um echte krankheitsverursachende Mutationen handelt.

Dass die neu identifizierten Mutationen jeweils nur einmal gefunden wurden, ist typisch für familiäre HCM, da an HCM erkrankte Familien zu einem Großteil "private" Mutationen tragen [McKenna 2012]. Das zeigen unter anderem die Untersuchungen von Richard et al, in denen 197 nichtverwandte Patienten mit HCM auf Mutationen getestet wurden. Bei 124 Patienten ($\approx 63\%$) wurden 97 verschiedene Mutationen identifiziert, davon 60 bis dato unbekannte [Richard 2003]. Dieser Aspekt der HCM ist eine Ursache für eine fehlende eindeutige Geno-Phänotyp-Korrelation. Eine andere Ursache ist die Modifikation des HCM-Phänotyps durch verschiedene Polymorphismen in anderen Genen, beispielsweise durch die verschiedenen Genotypen des *Angiotensin converting Enzyme* [McKenna 2012]. Welchen exakten Pathomechanismus die Mutationen p.Ala441Val und p.Arg545His nach sich ziehen und was der auslösende Stimulus für das kardiale Wachstum ist, bleibt unklar. Ob es ein Verlust an Stabilität des Zellkerns ist, welcher eine vermehrte Vulnerabilität der Myozyten zur Folge hat, und ob dieser eine sekundäre Hypertrophie bedingt, müssen weiterführende Untersuchungen zeigen. Da Lamin A/C auch indirekt mit Aktin interagiert, wäre auch eine Störung des kontraktilen Apparates denkbar.

Des Weiteren zeigen diese Ergebnisse einen neuen Aspekt der Vielfältigkeit der Laminopathien. Die HCM ist neben der DCM die zweite Herzmuskelerkrankung in der Gruppe der LMNA-bedingten Erkrankungen. In keinem anderen Gen führen Mutationen zu so vielen verschiedenen Phänotypen [Stewart 2007/1].

Interessanterweise liegen die gefundenen Mutationen in direkter Nachbarschaft zu LMNA-Mutationen, die einen vollkommen anderen Phänotyp zur Folge haben. Beispielsweise wurde in dem Nachbarkodon von Mutation p.Ala441Val die Mutation p.Val442Ala identifiziert, welche ebenso zu pathologischen Veränderungen der quergestreiften Muskulatur, im speziellen zum klinischen Bild der autosomal-dominanten EDMD, führt [Krimm 2002]. Diese

ist im Vollbild gekennzeichnet durch die klassische Trias aus frühzeitigen Muskelkontrakturen, humero-peroneal betonter Muskelschwäche und DCM in Kombination mit Störungen des Reizleitungsystems, wobei nicht alle Symptome vorliegen müssen. [Worman 2007]. Wie es sein kann, dass Mutation p.Ala441Val ausschließlich zu Veränderungen des Herzmuskels führt und Mutation p.Val442Ala auch den Skelettmuskel mit einbezieht, obwohl beide Mutationen in direkt benachbarten Kodons liegen, bleibt unklar. Die Mutation Val440Met, ebenfalls in direkter Nachbarschaft, hat hingegen eine Störung des Fettgewebes zur Folge, welche zum Phänotyp der FPLD führt. Die autosomal-dominante Erkrankung wird deutlich mit dem Beginn der Pubertät. Sie hat den langsamen Verlust des subkutanen Fettgewebes an den Extremitäten und die Akkumulation von Fettgewebe im Gesichts- und Halsbereich zur Folge. Zudem kommt es zur Entwicklung einer Insulinresistenz [Worman 2007]. Im Gegensatz zur EDMD und HCM bleiben Herz- und Skelettmuskelgewebe jedoch vollkommen unbeeinflusst.

Für die Mutation p.Arg545His konnten wir ähnliche Phänomene beobachten. Im nahegelegenen Kodon 541 sind bisher zwei Mutationen, p.Arg541His und p.Arg541Cys, bekannt. Während Mutation p.Arg541His zur EDMD führt, zeigten Patienten mit Mutation p.Arg541Cys eine DCM mit HRST [Krimm 2002]. Genau wie die HCM gehören beide Erkrankungen zu den pathologischen Veränderungen des quergestreiften Muskels. Demgegenüber steht die Mutation p.Lys542Asn, welche den Phänotyp des HGPS [Lanktree 2007], eine systemische Erkrankung mit vorzeitiger Alterung [Worman 2007], zur Folge hat. Eine primäre pathologische Veränderung des quergestreiften Muskelgewebes resultiert jedoch nicht.

Diese extreme Pleiotropie ist typisch für Mutationen im LMNA-Gen. Besonders interessant ist die Tatsache, dass auch ein und dieselbe Mutation unterschiedliche Phänotypen nach sich ziehen kann. Beispielsweise wurde Mutation p.Arg644Cys bereits bei Patienten mit einer DCM, einer EDMD, einer LGMD und dem atypischen HGPS nachgewiesen [Perrot 2009]. Hermida-Prieto et al zeigten, dass die LMNA-Mutation R190W auch innerhalb einer Familie zu unterschiedlichen Phänotypen, DCM und isolierte LVNC, führen kann [Hermida-Prieto 2004]. Wie diese unterschiedlichen Phänotypen und individuellen Krankheitsausprägungen zustande kommen, ist derzeit noch nicht geklärt. Eine Möglichkeit ist jedoch der Einfluss modifizierende Gene auf die Progression, die Penetranz und den Phänotyp verschiedener LMNA-Mutationen. Ein weiterer bisher nicht verstandener Sachverhalt ist die Tatsache, dass Lamin A/C als ubiquitär exprimierte Proteine in der Mehrzahl der Fälle (siehe Abb. 1.10)

zu Veränderungen in spezifischen Geweben, wie Muskel- und Fettgewebe, führen. Zur Erforschung der zugrundeliegenden Pathomechanismen wurden in den letzten Jahren verschiedene Mausmodelle etabliert. Beispielsweise zeigen homozygote Mäuse mit der LMNA-Mutation N195K den typischen Phänotyp einer DCM inklusive Störungen des Reizleitungssystems. Als Ursache wird eine Störung der Zellorganisation des Kardiomyozyten und/oder die Beeinflussung der Expression verschiedener TF gesehen. Warum jedoch ausschließlich Veränderungen des Muskelgewebes zu beobachten sind, konnte nicht geklärt werden [Mounkes 2005]. LMNA *knockout* Mäuse (LMNA $-/-$) entwickeln eine progressive DCM und eine Muskeldystrophie ohne jegliche Veränderungen des Fettgewebes und sterben in der achten postnatalen Woche. Die Pathogenese ist ebenfalls nicht vollständig geklärt, doch konnten Störungen der Myozytendifferenzierung und eine Verlagerung von Emerin vom Zellkern zum Endoplasmatischen Retikulum nachgewiesen werden. Haploinsuffiziente Mäuse (LMNA $+/-$) haben einen milderen Verlauf mit Manifestation der Symptome nach einem Jahr. Zusätzlich entwickeln sie interessanterweise die für Patienten mit LMNA-Mutationen typischen Arrhythmien [Nikolowa 2004, Stewart 2007/2]. Entgegen unserer Ergebnisse, beobachteten Cupesi et al bei haploinsuffizienten LMNA-Mäusen eine verminderte Hypertrophieantwort des Myokards auf eine dauerhafte Druckbelastung im Vergleich zum Wildtyp. Durch ein *banding* im Bereich des Aortenbogens wurde in den Mäusen iatrogen eine Druckbelastung für das Herz erschaffen. In der zwölften postoperativen Woche zeigten die LMNA $+/-$ - Mäuse eine signifikant geringere LV-Hypertrophie, signifikant geringeres Herzgewicht und einen signifikant größeren Querschnitt der einzelnen Kardiomyozyten. Die durchschnittliche Überlebenszeit war jedoch gleich. Pathophysiologisch soll dies möglicherweise auf eine reduzierte Aktivierung mechanosensitiver Gene, z.B. Egr-1, zurückzuführen sein. Der exakte Mechanismus ist jedoch nicht bekannt [Cupesi 2010]. Ob sich dies auf Patienten mit heterogenen Mutationen übertragen lässt, ist unklar.

In vielen *reviews* und Studien wird die HCM sehr oft als Sarkomererkrankung bezeichnet. Doch ist es zu einfach zu sagen, dass Mutationen in Genen die für Sarkomerproteine kodieren ausschließlich den Phänotyp der HCM zur Folge haben, genauso wie Mutationen in Genen die für Proteine des Zytoskeletts kodieren nicht allein zur DCM führen können. Beispielsweise wurde in einer genetischen Analyse von Patienten mit HCM im Endstadium, die eine Herztransplantation benötigten, Mutationen im Gen LAMP2 nachgewiesen. Es kodiert für ein Protein, welches in die Glucoseaufnahme und Glykolyse involviert ist. Da Patienten

mit Morbus Fabry, dem Noonan-Syndrom oder metabolischen Erkrankungen ausgeschlossen wurden, handelt es sich nicht um eine Phänokopie der HCM [Garcia-Pavia 2011]. Dass KM zu den heterogenetischen Erkrankungen gehören, steht heute außer Frage. Ein Vergleich aller KM-assoziierten Gene zeigt jedoch eine nicht unwesentliche Anzahl an Überlappungen dieser Gene als Ursache für verschiedene KM. Perrot et al diskutierten dies bereits 2007. Zu dem Zeitpunkt belief sich die Zahl der Gene, die mit mindesten zwei verschiedenen KM assoziiert sind, noch auf elf Stück [Perrot 2007]. Seither sind einige hinzugekommen. Die stetig wachsende Zahl lässt vermuten, dass in den nächsten Jahren aufgrund einfacherer und kostengünstigerer genetischer Analysen noch mehr Gene hinzukommen werden.

Ein Beispiel ist das Gen Vinculin, das für die Zytoskelett Proteine Vinculin und Metavinculin kodiert, welche wichtig für die Verankerung von Aktin innerhalb der Glanzstreifen sind. Mutationen innerhalb des Gens können sowohl zur DCM als auch zur HCM führen. Von besonderem Interesse ist die Mutation R975W, da sie bei Patienten mit einer HCM und bei Patienten mit einer DCM identifiziert werden konnte. Sie liegt im Genabschnitt der speziell für Metavinculin kodiert, einer muskelspezifischen Isoform von Vinculin. Welche Pathomechanismen und zusätzlichen Einflussfaktoren genau für die unterschiedlichen Phänotypen verantwortlich sind, ist bisher ebenfalls unklar [Vasile 2006]. In Abbildung 5.3 sind die einzelnen Proteindomänen von Vinculin/Metavinculin mit den zugehörigen Mutationen dargestellt. Wie deutlich erkennbar, können die verschiedenen Erkrankungen keiner bestimmten Domäne zugeordnet werden.

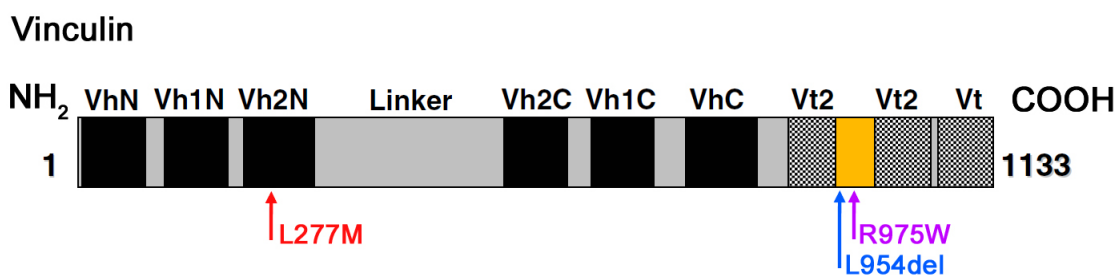


Abbildung 5.3: Genstruktur von Vinculin mit den verschiedenen Proteindomänen und den Kardiomyopathie assoziierten Mutationen. Der Metavinculin spezifische Genabschnitt ist orange markiert. *Head-domain* von Vinculin - VhN/C, Vh1N/C und Vh2N/C. *Tail-domain* von Vinculin - Vt und Vt2. Rot - HCM-assoziierte Mutation, blau - DCM assoziierte Mutation, lila - HCM und DCM assoziierte Mutation. Modifiziert nach [Vasile 2006].

Genau wie Vinculin [Vasile 2006] wird LMNA ubiquitär exprimiert und gehört demnach zu den wenigen Genen, die obwohl sie nicht organ- oder gewebsspezifische Proteine kodieren, zu gewebsspezifische Veränderungen, in unserem Fall zu isolierter HCM, führen können. Abbildung 5.4 gibt eine Übersicht der KM-assozierten Gene und deren Überlappungen für die drei bedeutendsten KM. Unsere Ergebnisse erweitern den Überlappungsbereich um ein zusätzliches Gen.

Genetik der Kardiomyopathien

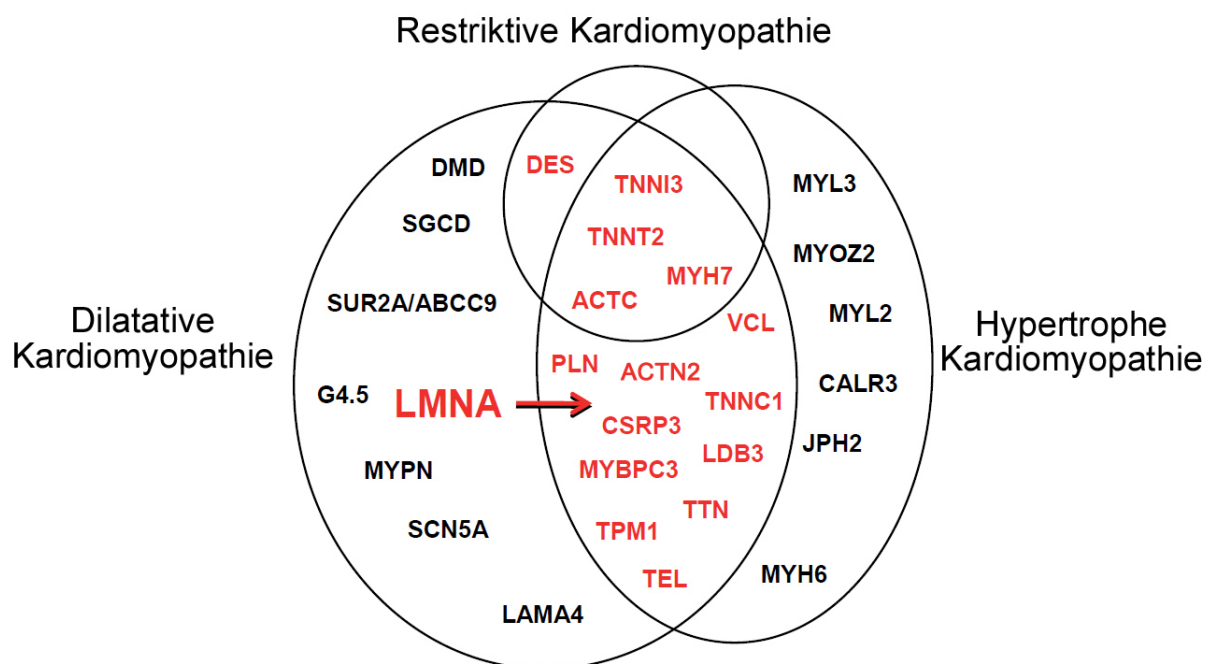


Abbildung 5.4: Vergleich der krankheitsassoziierten Gene verschiedener KM mit den dazugehörigen Überlappungen. Von 29 Genen verursachen 17 mindestens zwei unterschiedliche Formen isolierter KM. Die KM-assozierten Gene sind: Myosin-bindendes Protein C (MYBPC3), β -Myosin schwere Kette (MYH7), α -Myosin schwere Kette (MYH6), kardiales Troponin T (TNNT2), kardiales Troponin I (TNNI3), kardiales Troponin C (TNNC1), kardiales Aktin (ACTC), α -Aktinin 2 (ACTN2), Titin (TTN), Titin-cap/ Telethonin (TEL), α -Tropomyosin (TPM1), regulatorische leichte Kette (MYL2), essenzielle leichte Kette (MYL3), Muskel LIM Protein (CSRP3), Myozenin 2 (MYOZ2), Myopalladin (MYPN), ATP-sensitiver Kaliumkanal (SUR2A/ABCC9), δ -Sarcoglycan (SGCD), Tafazzin (G4.5), Junctophilin 2 (JPH2), Calreticulin (CALR3), LIM bindende Domäne 3 (LDB3), Lamin A/C (LMNA), Metavinculin (VCL), Phospholamban (PLN), Dystrophin (DMD), Desmin (DES), Laminin α -4 (LAMA4), kardialer Natriumkanal (SCN5A). Modifiziert nach [Hershberger 2009, Perrot 2007]

Die neu entdeckten Mutationen unterstreichen die Annahme, dass es sich bei KM um echte allelische Erkrankungen handelt. Das bedeutet, dass alle KM denselben genetischen Ursprung haben [McKenna 2012, Perry 2007]. Dafür spricht ebenfalls, dass es immer wieder

überlappende Phänotypen gibt [Connolly 2011], wie z.B. der Fall eines 26-jährigen Patienten der Merkmale einer HCM und einer LVNC zeigte [Kelley-Hedgepeth 2009]. Letztendlich ist der individuelle Phänotyp das Ergebnis des Zusammenspiels zwischen der krankheitsverursachenden Mutation, deren Einfluss auf die RNA und Proteinexpression und wiederum der Folgen dieser Veränderungen, prädisponierenden und modifizierenden genetischen Polymorphismen und verschiedenen Umweltfaktoren.

5.8 Fazit und ein Ausblick in die Zukunft

In der vorliegenden Arbeit wurden die ersten HCM-assoziierten LMNA-Mutationen beschrieben. Für krankheitsverursachende Mutationen spricht, dass es sich bei den gefundenen Varianten um sehr seltene Varianten handelt, welche zudem je in einem Kollektiv von 300 nicht-verwandten gesunden Kontrollpersonen ausgeschlossen wurden. Die betroffenen Patienten wiesen den typischen Phänotyp einer HCM auf. Weiterhin befindet sich sowohl Mutation p.Ala441Val als auch Mutation p.Arg545His in einem evolutionär hochkonservierten Proteindomänenbereich. Beide Patienten stammen aus Kollektiv 1, welches zuvor auf genetische Varianten in den bereits bekannten HCM-Genen untersucht wurde und diese sich als negativ erwiesen. Eine weitere HCM-assoziierte Mutation innerhalb der Patienten ist damit sehr unwahrscheinlich, doch kann es nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden, da wie bereits erwähnt mit der Identifikation weiterer HCM-Gene zu rechnen ist. Leider war es bisher nicht möglich Familienangehörige einer genetischen Untersuchung zu unterziehen um eine sichere Aussage über den Vererbungsmodus zu treffen. Jedoch ist ein autosomal-dominanter Erbgang, wie bei der familiären HCM und der laminassozierten DCM, wahrscheinlich. Die anamnestische Angabe eines an HCM erkrankten Sohnes bei Patient 1213 mit der Mutation p.Ala441Val weist ebenfalls darauf hin.

In einem weiteren Schritt wäre es wichtig, nach ausführlicher Stammbaumanalyse der Patienten, die Auswirkung der identifizierten Mutationen auf Proteinebene zu untersuchen, z.B. durch eine Zellkulturstudie. Eine andere Möglichkeit ist die Mutationen an einem geeigneten Tiermodell zu untersuchen. Vorstellbar wäre die Erschaffung genetisch modifizierter Mäuse, die auch in vielen anderen Studien sehr hilfreich sind, um die Folgen bestimmter genetischer Varianten auf die Entstehung einzelner KM zu untersuchen.

Für die Zukunft ist die Erarbeitung einheitlicher diagnostischer Richtlinien für alle KM einschließlich ihrer genetischen Untersuchung wichtig. Im Moment wäre eine flächendeckende

genetische Untersuchung aller KM-Patienten jedoch zu teuer und nicht sensitiv genug, aufgrund fehlenden Wissens über Geno-Phänotyp-Korrelationen und das genetische Spektrum [Malhotra 2009]. Doch wann ist es sinnvoll Patienten auf genetische Variationen zu untersuchen? Speziell für die HCM ist diese Frage nicht leicht zu beantworten, aufgrund der oft "privaten" Mutationen, welche eine komplette Sequenzierung der HCM-assoziierten Gene erfordert. Zudem tragen ungefähr 5 % mehr als eine Mutation. Es kann davon ausgegangen werden, dass weder alle KM-assoziierten Gene noch alle Mutationen in den bisher identifizierten Genen nachgewiesen wurden. Doch hilft meist nur eine genetische Analyse um zwischen *high-* und *low risk* Patienten zu unterscheiden [McKenna 2012]. Auch wenn das Wissen um die einzelne Mutation nicht immer Auswirkungen oder Vorteile für den einzelnen Patienten mit sich bringt, ist es jedoch enorm wichtig. Zum einen um die Pathogenese der KM besser zu verstehen und daraus mögliche therapeutische Rückschlüsse zu ziehen und zum anderen um Korrelationen zwischen bestimmten genetischen Variationen und phänotypischen Merkmalen zu ermitteln. Beispiel einer solchen Korrelation, ist das Auftreten von HRST bei Patienten mit LMNA-bedingter DCM, bei denen eine genetische Untersuchung empfehlenswert ist [Perrot 2009]. Unsere Ergebnisse geben nun den Hinweis auf eine mögliche Korrelation zwischen LMNA-bedingter KM im Allgemeinen und HRST. Um dies zu bestätigen sind allerdings weitere Untersuchungen notwendig.

6 Zusammenfassung

Kardiomyopathien sind eine sehr heterogene Gruppe von Herzmuskelerkrankungen mit pathologischen funktionellen und strukturellen Veränderungen des Herzmuskels, die ohne den Einfluss einer Koronaren Herzkrankheit, Hypertonie, Herzklappenerkrankungen oder kongenitalen Herzfehlern entstehen. Die Hypertrophe Kardiomyopathie (HCM) ist mit einer Prävalenz von 1:500 die häufigste genetisch bedingte kardiovaskuläre Erkrankung und die häufigste Ursache für einen plötzlichen Herztod unter 35 Jahren. Sie ist charakterisiert durch eine meist asymmetrische Hypertrophie des Myokards, vor allem im Bereich des Septums und des linken Ventrikels. Bisher konnten in über 20 Genen zahlreiche Mutationen identifiziert werden, wobei ungefähr 70 % in den Genen MYH7 und MYBPC3 liegen, welche für die Sarkomerproteine β -Myosin schwere Kette und Myosin-bindendes Protein C kodieren. Die Linksventrikuläre *Non-Compaction* Kardiomyopathie (LVNC) ist eine weitaus seltenere Kardiomyopathie. Sie zeichnet sich durch die typische zweischichtige Optik, bestehend aus einer kompaktierten epikardialen- und einer nicht-kompaktierten endokardialen Schicht, aus. Die Pathogenese der LVNC ist weit weniger erforscht, jedoch wird in mindestens 50 % der Fälle von einem genetischen Ursprung ausgegangen. Das LMNA-Gen, eines der häufigsten Krankheitsgene für familiäre Dilatative Kardiomyopathie (fDCM), stand im Mittelpunkt unserer Untersuchungen. Es umfasst zwölf kodierende Exons, welche für die Proteine Lamin A/C kodieren. Diese gehören zu den Intermediärfilamenten Typ V und bilden zusammen mit anderen Proteinen die Kernlamina, ein dichtes Netzwerk unter der inneren Kernmembran. Lamin A/C sind wichtig für die Stabilität des Zellkerns, haben Einfluss Zellproliferation und -differenzierung und übernehmen wichtige Funktionen innerhalb verschiedener Zellvorgänge. Da es auch andere Krankheitsgene mit pleiotropen Effekten bezüglich des myokardialen Phänotyps gibt, beschäftigt sich die vorliegende Arbeit mit der Frage: "Gibt es genetische Varianten im Lamin A/C-Gen bei Patienten mit HCM oder LVNC?". Zur Beantwortung dieser Frage untersuchten wir alle zwölf kodierenden Exons von LMNA in drei verschiedenen Patientenkollektiven, einem HCM-Kollektiv mit Ausschluss von Mutation in den bisher bekannten HCM-Genen (K1), einem nicht-selektierten HCM-Kollektiv (K2) und einem LVNC-Kollektiv (K3). Die Patientenrekrutierung und -diagnostik erfolgte mittels Echokardiographie, EKG und Herzkatheterisierung. Die Amplifikation und Sequenzierung der DNA erfolgte durch genetische Standardmethoden.

In allen Kollektiven konnten zahlreiche bekannte und unbekannte synonyme *Single Nucleo-*

tide Polymorphism nachgewiesen werden. Interessanterweise konnten in K1 (72 Patienten) zwei bis dato unbekannte nicht-synonyme heterozygote Missense-Mutationen in zwei nicht-verwandten Patienten identifiziert werden. Die Variante c.1322C>T in Exon 7 führt zur Substitution von Alanin gegen Valin im Kodon 441 (p.Ala441Val) und die Variante c.1634G>A in Exon 10 hat den Austausch der Aminosäure Arginin gegen Histidin im Kodon 545 (p.Arg545His) zur Folge. Die betroffenen Aminosäuren sind hochkonserviert in verschiedenen Spezies. Beide liegen in der *Ig-like domain*, die wichtige Funktionen in der LAP2 α - und Emerinbindung übernimmt. Der Ausschluss dieser Mutationen in 300 Kontrollpatienten erfolgte mithilfe eines Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus. Die betroffenen HCM-Patienten zeigen die typische linksventrikuläre Hypertrophie. Zusätzlich leiden beide an verschiedenen Formen kardialer Arrhythmien. Diese Tatsache ist besonders interessant, da Störungen des Reizleitungssystems typisch für die LMNA-assoziierte fDCM sind.

In der vorliegenden Arbeit werden die ersten LMNA-Mutationen bei Patienten mit HCM beschrieben. Diese Unterstreichen die Annahme, dass es sich bei Kardiomyopathien um echte allelische Erkrankungen handelt. Ob das Vorhandensein von Herzrhythmusstörungen ein spezifisches Merkmal der LMNA-assoziierten HCM ist, gilt es durch Untersuchungen größerer Kohorten herauszufinden. Weiterhin zeigen unsere Ergebnisse einen neuen Aspekt der Vielfältigkeit der Laminopathien. HCM ist demnach die zweite Herzmuskelerkrankung in dieser Gruppe von Erkrankungen.

Literatur

- [Aebi 1986] Aebi U, Cohn J, Buhle L, Gerace L. The nuclear lamina is a meshwork of intermediate-type filaments. *Nature* 1986;323:560-564.
- [Ahmad 2005] Ahmad F, Seidman JG, Seidman CE. The genetic basis for cardiac remodeling. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2005;6:185-216.
- [Alcalai 2008] Alcalai R, Seidman JG, Seidman CE. Genetic basis of hypertrophic cardiomyopathy: from bench to the clinics. *J Cardiovasc Electrophysiol* 2008;19:104-110.
- [Bangsow 1996] Bangsow T, Schäfer T. Sequenzbestimmung von Nucleinsäuren und Proteinen. Gassen HG, Minol K. *Gentechnik*. 4.Auflage. Stuttgart: Gustav Fischer Verlag, 1996:242-257.
- [Bangsow 2007] Bangsow T, Deutsch U, Engel H, Korfhage C, Löffert D. Polymerase-Kettenreaktion (PCR). Jansohn M. *Gentechnische Methoden*. 4.Auflage. München: Elsevier GmbH - Spektrum Akademischer Verlag, 2007:153-186.
- [Belanger 2008] Belanger AR, Miller MA, Donthireddin UR, Najovits AJ, Goldmann ME. New classification scheme of left ventricular non compaction and correlation with ventricular performance. *Am J Cardiol* 2008;102:92-96.
- [Bleyl 1997] Bleyl SB, Mumford BR, Thompson V, Carey JC, Pysher TJ, Chin TK, Ward K. Neonatal, lethal noncompaction of the left ventricular myocardium is allelic with Barth syndrome. *Am J Hum Genet* 1997;61:868-872.
- [Bos 2009] Bos JM, Towbin JA, Ackerman MJ. Diagnostic, prognostic, and therapeutic implications of genetic testing for hypertrophic cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 2009;54:201-211.
- [Brodsky 2000] Brodsky GL, Muntoni F, Miodic S, Sinagra G, Sewry C, Mestroni L. Lamin A/C gene mutation associated with dilated cardiomyopathy with variable skeletal muscle involvement. *Circulation* 2000;101:473-476.

- [Broers 2006] Broers JLV, Ramaekers FCS, Bonne G, Ben Yaou R, Hutchison CJ. Nuclear lamins: laminopathies and their role in premature ageing. *Physiol Rev* 2006;86:967-1008.
- [Brown 2007] Brown TA. Die Polymerasekettenreaktion (PCR). Brown TA. *Gentechnologie für Einsteiger*. 5.Auflage. München: Elsevier GmbH - Spektrum Akademischer Verlag, 2007:199-214.
- [Burke 2002] Burke B, Ellenberg J. Remodelling the walls of the nucleus. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002;3:487-97.
- [Captur 2010] Captur G, Nihoyannopoulos P. Left ventricular non-compaction: genetic heterogeneity, diagnosis and clinical course. *Int J Cardiol* 2010;140:145-53.
- [CHEMIE.DE] From Sephadex to GE Healthcare. Berlin. CHEMIE.DE Information Service GmbH 1997-2011 (Accessed September 19 2011, at <http://www.chemieurope.com/en/whitepapers/47068/from-sephadex-to-ge-healthcare.html>)
- [Chin 1990] Chin TK, Perloff JK, Williams RG, Kenneth J, Mohrmann R. Isolated non-compaction of left ventricular myocardium - a study of eight cases. *Circulation* 1990;82:507-513.
- [Connolly 2011] Connolly HM, Attenhofer Jost CH. Isolated left ventricular noncompaction. (Accessed May 25 2012, at <http://www.uptodate.com/contents/isolated-left-ventricular-noncompaction?view=print>)
- [Cupesi 2010] Cupesi M, Yoshioka J, Gannon J et al. Attenuated hypertrophic response to pressure overload in lamin A/C haploinsufficiency mouse. *J Mol Cell Cardiol* 2010;48:1290-1297.
- [Davies 2010] Davies BSJ, Barnes RH, Tu Y. An accumulation of non-farnesylated prelamin A causes cardiomyopathy but not progeria. *Hum Mol Genet* 2010;19:2682-2694.
- [Dechat 2008] Dechat T, Pflieger K, Sengupta K et al. Nuclear lamins: major factors in the structural organization and function of the nucleus and chromatin. *Genes Dev* 2008;22:832-853.

- [Dechert 2007] Dechert U. Gelelektrophoresen. Jansohn M. Gentechnische Methoden. 4. Auflage. München: Elsevier GmbH - Spektrum Akademischer Verlag, 2007:39-89.
- [Dellefave 2010] Dellefave L, McNally EM. The genetics of dilated cardiomyopathy. *Curr Opin Cardiol* 2010;25:198-204.
- [Dhe-Paganon 2002] Dhe-Paganon S, Werner ED, Chi Y, Shoelson SE. Structure of the globular tail of nuclear lamin. *J Biol Chem* 2002;277:17381-17384.
- [Don 1991] Don RH, Cox PT, Wainwright BJ, Baker K, Mattick JS. 'Touchdown' PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. *Nucl Acids Res* 1991;19:4008.
- [Elliot 2007] Elliot P, Andersson B, Arbustini E, et al. Classification of the cardiomyopathies: a positions statement from the european society of cardiology working group on myocardial and pericardial diseases. *Eur Heart J* 2007;29:270-276.
- [Elliot 2008] Elliot P. The 2006 American Heart Association classification of cardiomyopathies is not the gold standard. *Circ Heart Fail* 2008;1:77-80.
- [Elliot 2012] Elliot PM, McKenna WJ. Diagnosis and evaluation of hypertrophic cardiomyopathy, 2012. (Accessed May 21 2012, at <http://www.uptodate.com/contents/diagnosis-and-evaluation-of-hypertrophic-cardiomyopathy?view=print>)
- [Engberding 1984] Engberding R, Bender F. Echocardiographic detection of persistent myocardial sinusoids. *Z Kardiol* 1984;73:786-788.
- [ensemble.org] Transcript:LMNA-001 ENST00000368300, 2010 (Accessed December 13 2010, at http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Transcript/Summary?db=core;g=ENSG00000160789;r=1:156052364-156109880;t=ENST00000368300).
- [Eshleman 2005] Eshleman SH, Crutcher G, Petrauskene O, et al. Sensitivity and specificity of the viroseq human immunodeficiency virus typ 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;43:813-817.

- [Everett 2005] Everett AD, Lim DS. Hypertrophic Cardiomyopathy. Everett AD, Lim DS. Illustrated Field Guide to Congenital Heart Disease and Repair. 2. Auflage. Charlottesville: Scientific Software Solutions, 2004, 2005:70-71.
- [Favreau 2004] Favreau C, Higuete D, Courvalin JC, Buendia B. Expression of a mutant lamin A that causes Emery–Dreifuss muscular dystrophy inhibits in vitro differentiation of C2C12 myoblasts. *Mol Cell Biol* 2004;24:1481–1492.
- [Finsterer 2009] Finsterer J. Cardiogenetics, neurogenetics, and pathogenetics of left ventricular hypertrabeculation/ noncompaction. *Pediatr Cardiol* 2009;30:659–681.
- [FIZ CHEMIE 2011] Aminosäuren. Berlin: FIZ CHEMIE Fachinformationszentrum Chemie GmbH, 2012. (Accessed November 18 2011, at <http://www.chemgapedia.de/vsengine/vlu/vsc/de/ch/8/bc/vlu/proteine/aminosaeuren.vlu/> Page/vsc/de/ch/8/bc/proteine/aminos_u_einleit/index2.vscml.html)
- [Geisterfer-Lowrance 1990] Geisterfer-Lowrance AA, Kass S, Tanigawa G, Vosberg HP, McKenna W, Seidman CE, Seidman JG. A molecular basis for familial hypertrophic cardiomyopathy: a beta cardiac myosin heavy chain gene missense mutation. *Cell* 1990;62:999-1006.
- [Garcia-Pavia 2011] Garcia-Pavia P, Vázquez ME, Segovia J et al. Genetic basis of end-stage hypertrophic cardiomyopathy. *Eur J Heart Fail* 2011;13:1193–1201.
- [Hagège 2009] Hagège AA, Desnos M. New trends in treatment of hypertrophic cardiomyopathy. *Arch Cardiovasc Dis* 2009;102:441-447.
- [Hermida-Prieto 2004] Hermida-Prieto M, Monserrat L, Castro-Beiras RL et al. Familial dilated cardiomyopathy and isolated ventricular noncompaction associated with lamin A/C gene mutations. *Am J Cardiol* 2004;94:50-54.
- [Hershberger 2009] Hershberger RE, Cowan J, Morales A, Siegfried JD. Progress with genetic cardiomyopathies: screening, counseling, and testing in dilated, hypertrophic, and arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy. *Circ Heart Fail* 2009;2:253-261.

- [Holtz 1989] Holtz D, Tanaka RA, Hartwig J, McKeon F. The CaaX motif of lamin A functions in conjunction with the nuclear localization signal to target assembly to the nuclear envelope. *Cell* 1989;59:969-977.
- [Hozák 1996] Hozák P, Sasseville MJ, Raymond Y, Cook PR. Lamin proteins form an internal nucleoskeleton as well as a peripheral lamina in human cells. *J Cell Sci* 1996;106:635-644.
- [ICD-10] Internationale Statistische Klassifikation der Krankheiten und verwandter Gesundheitsprobleme. Köln: Deutsches Institut für Medizinische Dokumentation und Information, 2006. (Accessed April 18 2010, at <http://www.dimdi.de/dynamic/de/klassi/diagnosen/icd10/htmlamtl2006/fr-icd.htm>)
- [Isobe 2007] Isobe K, Gohara R, Ueda T, Takasaki Y, Ando S. 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;71:1252-1259.
- [Jefferies 2010] Jefferies JL, Towbin J. Dilated cardiomyopathy. *Lancet* 2010;375:752-762.
- [Jenni 2001] Jenni R, Oechslin E, Schneider J, Attenhofer Jost C, Kaufmann PA. Echocardiographic and pathomorphological characteristics of isolated left ventricular non-compaction: a step towards classification as a distinct cardiomyopathy. *Heart* 2001;86:666-671.
- [Johnson 2004] Johnson BR, Nitta RT, Frock RL et al. A-type lamins regulate retinoblastoma protein function by promoting subnuclear localization and preventing proteasomal degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101:9677-9682.
- [Kelly 2009] Kelly M, Semsarian C. Multiple mutations in genetic cardiovascular disease - a marker of disease severity. *Circ Cardiovasc Genet* 2009;2:182-190.
- [Kelley-Hedgpeth 2009] Kelley-Hedgpeth A, Towbin JA, Maron MS. Overlapping phenotypes - left ventricular noncompaction and hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation* 2009;119:588-589.

- [Kennedy 2000] Kennedy DK, Barbie DA, Classon M, Dyson N, Harlow E. Nuclear organization of DNA replication in primary mammalian cells. *Genes Dev* 2000;14:2855–2868.
- [Keren 2008] Keren A, Syrris P, McKenna WJ. Hypertrophic cardiomyopathy: the genetic determinants of clinical disease expression. *Nature* 2008;5:158-166.
- [Klaassen 2008] Klaassen S, Probst S, Oechslin, E et al. Mutations in sarcomere protein genes in left ventricular noncompaction. *Circulation* 2008;117:2893-2901.
- [Klapper 1997] Klapper M, Exner K, Kempf A, et al. Assembly of A- and B-type lamins studied in vivo with the baculovirus system. *J Cell Sci* 1997;110:2519-2532.
- [Korbie 2008] Korbie DJ, Mattick JS. Touchdown PCR for increased specificity and sensitivity in PCR amplification. *Nat Protoc* 2008;3:1452-1456.
- [Krimm 2002] Krimm I, Östlund C, Gilquin B, et al. The Ig-like structure of the C-terminal domain of Lamin A/C, mutated in muscular dystrophies, cardiomyopathy, and partial lipodystrophy. *Structure* 2002;10:811-823.
- [Kumaran 2002] Kumaran RI, Muralikrishna B, ParnaikVK. Lamin A/C speckles mediate spatial organization of splicing factor compartments and RNA polymerase II transcription. *J Cell Biol* 2002;159:783–793.
- [Kyte 1982] Kyte J, Doolittle RF. A simple method for displaying the hydrophobic character of a protein. *J Mol Biol* 1982;157:105-132.
- [Lanktree 2007] Lanktree M, Cao H, Rabkin SW, Hanna A, Hagele RA, et al. Novel LMNA mutations seen in patients with familial partial lipodystrophy subtype 2. *Clin Genet* 2007;71:183–186.
- [Lloyd 2002] Lloyd DJ, Trembath RC, Shackleton S. A novel interaction between lamin and SREBP1: implications for partial lipodystrophy and other laminopathies. *Hum Mol Genet* 2002;11:769-777.
- [Lu 2011] Lu JT, Muchir A, Nagy PL, Worman HJ. LMNA cardiomyopathy: cell biology and genetics meet clinical medicine. *Dis Model Mech* 2011;4:562-568.

- [Lutz 1992] Lutz RJ, Trujillo MA, Denham KS, Wenger L, Sinensky M. Nucleoplasmic localization of prelamin A: implications for prenylation-dependent lamin A assembly into the nuclear lamina. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:3000-3004.
- [Malhotra 2009] Malhotra R, Mason PK. Lamin A/C deficiency as a cause of familial dilated cardiomyopathy. *Curr Opin Cardiol* 2009;24:203-208.
- [Markiewicz 2005] Markiewicz E, Ledran M, Hutchison CJ. Remodelling of the nuclear lamina and nucleoskeleton is required for skeletal muscle differentiation in vitro. *J Cell Sci* 2005;118:409-420.
- [Maron 2006] Maron BJ, Towbin JA, Thiene G. Contemporary definitions and classification of the cardiomyopathies. *Circulation* 2006;113:1807-1816.
- [Maron 2008/1] Maron BJ. The 2006 American Heart Association classification of cardiomyopathies is the gold standard. *Circ Heart Fail* 2008;1:72-76.
- [Maron 2008/2] Maron BJ. Hypertrophic Cardiomyopathy. Libby P, Bonow RO, Mann DL, Zipes DP, Braunwald E. *BRAUNWALD'S Heart Disease*. Philadelphia: Saunders Elsevier, 2008:1763-1773.
- [Mattout 2007] Mattout A, Goldberg M, Tzur Y, Margalit A, Gruenbaum Y. Specific and conserved sequences in *D. melanogaster* and *C. elegans* lamins and histone H2A mediate the attachment of lamins to chromosomes. *J Cell Sci* 2007;120:77-85.
- [McKenna 2012] McKenna WJ. Genetics of hypertrophic cardiomyopathy, 2012. (Accessed May 21 2012, at <http://www.uptodate.com/contents/genetics-of-hypertrophic-cardiomyopathy?view=print>)
- [Meckelein 2007] Meckelein B, Frey A. Anhang 1 Sequenzierung von DNA. Jansohn M. *Genetische Methoden*. 4. Auflage. München: Elsevier GmbH - Spektrum Akademischer Verlag, 2007:555-576.
- [Merideth 2008] Merideth MA, Gordon LB, Clauss S, et al. Phenotype and course of Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *N Engl J Med* 2008;358:592-604.

- [Minol 1996] Minol K. Die Polymerasekettenreaktion (PCR). Gassen HG, Minol K. Gentechnik. 4.Auflage. Stuttgart: Gustav Fischer Verlag, 1996:292-329.
- [Moir 2000] Moir RD, Spann TP, Herrmann H, Goldman RD. Disruption of nuclear lamin organization blocks the elongation phase of DNA Replication. *J Cell Biol* 2000;149:1179–1191.
- [Mounkes 2005] Mounkes LC, Kozlov SV, Rottman JN, Stewart CL. Expression of an LMNA-N195K variant of A-type lamins results in cardiac conduction defects and death in mice. *Hum Mol Genet* 2005;14:2167–2180.
- [Muchir 2000] Muchir A, Bonne G, van der Kooi AJ, et al. Identification of mutations in the gene encoding for lamins A/C in autosomal dominant limb girdle muscular dystrophy with atrioventricular conduction disturbances (LGMD1B). *Hum Mol Genet* 2000;9:1453-1459.
- [Mülhardt 2009/1] Mülhardt C. Polymerasekettenreaktion (PCR). Mülhardt C. Der Experimentator. 6.Auflage. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag, 2009:84-120.
- [Mülhardt 2009/2] Mülhardt C. DNA-Analyse. Mülhardt C. Der Experimentator. 6.Auflage. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag, 2009:192-221.
- [Nikolowa 2004] Nikolowa V, Leimena C, McMahon AC, et al. Defects in nuclear structure and function promote dilated cardiomyopathy in lamin A/C-deficient mice. *J Clin Invest* 2004;113:357-369.
- [Oechslin 2000] Oechslin EN, Attenhofer Jost CH, Rojas JR, Kaufmann PA, Jenni R. Long-term follow-up of 34 adults with isolated left ventricular noncompaction: a distinct cardiomyopathy with poor prognosis. *J Am Coll Cardiol* 2000;36:493-500.
- [Pankuweit 2008] Pankuweit S, Richter A, Ruppert V, Funck R, Maisch B. Klassifikation, genetische Prädisposition und Risikofaktoren für die Entwicklung einer Kardiomyopathie. *Internist (Berl)* 2008;49:441-447.

- [Parry 1986] Parry DAD, Conway JF, Steinert PM. Structural studies on lamin. Similarities and differences between lamin and intermediate-filament proteins. *Biochem J* 1986;238:305-308.
- [Pauli 1999] Pauli RM, Scheib-Wixted S, Cripe L, Izumo S, Sekhon GS. Ventricular noncompaction and distal chromosome 5q deletion. *Am J Med Genet* 1999;85:419-423.
- [Perrot 2007] Perrot A, Dietz R, Osterziel KJ. Is there a common genetic basis for all familial cardiomyopathies. *Eur J Heart Fail* 2007;9:4-6.
- [Perrot 2009] Perrot A, Hussein S, Ruppert V et al. Identification of mutational hot spots in LMNA encoding lamin A/C in patients with familial dilated cardiomyopathy. *Basic Res Cardiol* 2009;104:90-99.
- [Perry 2007] Perry E, Bert A, Eloisa A. Classification of the cardiomyopathies: a positions statement from the european society of cardiology working group on myocardial and pericardial diseases. *Eur Heart J* 2007;29:270-276.
- [Peter 1990] Peter M, Nakagawa J, Dorée M, Labbé JC, Nigg EA. In vitro disassembly of the nuclear lamina and M phase-specific phosphorylation of lamins by cdc2 kinase. *Cell* 1990;61:591-60.
- [Petersen 2005] Petersen SE, Selvanayagam JB, Wiesmann F, et al. Left Ventricular non-compaction - insights from cardiovascular magnetic resonance imaging. *J Am Coll Cardiol* 2005;46:101-105.
- [Richard 2003] Richard P, Charron P, Carrier L. Hypertrophic cardiomyopathy: distribution of disease genes, spectrum of mutations, and implications for a molecular diagnosis strategy. *Circulation* 2003;107:2227-2232.
- [Richardson 1996] Richardson P, McKenna W, Bristow M, 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;93:841-842.
- [Roberts 2005] Roberts R, Sigwart U. Current concepts of the pathogenesis and treatment of hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation* 2005;112:293-296.

- [Saga 2009] Saga A, Karibe A, Otomo J, et al. Lamin A/C gene mutations in familial cardiomyopathy with advanced atrioventricular block and arrhythmia. *Tohoku J Exp Med* 2009;218:309-316.
- [Sata 1996] Sata M, Ikebe M. Functional analysis of the mutations in the human cardiac beta-myosin that are responsible for familial hypertrophic cardiomyopathy. Implication for the clinical outcome. *J Clin Invest* 1996;98:2866-2873.
- [Sarma 2010] Sarma RJ, Chana A, Elkayam U. Left ventricular noncompaction. *Prog Cardiovasc Dis* 2010;52:264-273.
- [Semsarian 2007] Semsarian C, et al. Guidelines for the Diagnosis and Management of Hypertrophic Cardiomyopathy. *Heart Lung Circ* 2007;16:16-18.
- [Stewart 2007/1] Stewart CL, Roux KJ, Burke B. Blurring the boundary: the nuclear envelope extends its reach. *Science* 2007;318:1408-1412.
- [Stewart 2007/2] Stewart CL, Kozlov S, Fong LG, Young SG. Mouse models of the laminopathies. *Exp Cell Res* 2007;313:2144-2156.
- [Stöllberger 2002] Stöllberger C, Finsterer J, Blazek G. Left ventricular hypertrabeculation/noncompaction and association with additional cardiac abnormalities and neuromuscular disorders. *Am J Cardiol* 2002;90:899-902.
- [Stuurman 1998] Stuurman N, Heins S, Aebi U. Nuclear lamins: their structure, assembly and interactions. *J Struct Biol* 1998;122:42-66.
- [Sullivan 1999] Sullivan T, Escalante-Alcalde D, Bhatt H, et al. Loss of A-type lamin expression compromises nuclear envelope integrity leading to muscular dystrophy. *J Cell Biol* 1999;147:913-919.
- [Taylor 2004] Taylor MR, Robinson ML, Mestroni L. Analysis of genetic variations of lamin A/C gene (LMNA) by denaturing high-performance liquid chromatography. *J Biomol Screen* 2004;625-628.
- [Taylor 2006] Taylor MR, Carniel E, Mestroni L. Cardiomyopathy, familial dilated. *Orphanet J Rare Dis* 2006;1:27.

- [Tyska 2000] Tyska MJ, Hayes E, Giewat M, Seidman CE, Seidman JG, Warshaw DM. Single-molecule mechanics of R403Q cardiac myosin isolated from the mouse model of familial hypertrophic cardiomyopathy. *Circ Res* 2000;86:737-744.
- [Twyman 2003] Twyman RM, Primrose SB. Techniques patents for SNP genotyping. *Pharmacogenomics* 2003;4:67-79.
- [UMD 2010] The Universal Mutation Database, 2010. (Accessed November 09 2010, at <http://www.umd.be:2000>)
- [UniProt 2011] The Universal Protein Resource (UniProt), 2011. (Accessed October 14 2011, at <http://www.uniprot.org/uniprot/P02545>)
- [Van Berlo 2005] Van Berlo JH, Voncken JW, Kubben N, et al. A-type lamins are essential for TGF- β 1 induced PP2A to dephosphorylate transcription factors. *Hum Mol Genet* 2005;14:2839–2849.
- [Vasile 2006] Vasile VC, Ommen SR, Edwards WD, Ackerman MJ. A missense mutation in a ubiquitously expressed protein, vinculin, confers susceptibility to hypertrophic cardiomyopathy. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;345:998-1003.
- [WHO/ISFC 1980] WHO/ ISFC task force. Report of the WHO/ISFC task force on the definition and classification of cardiomyopathies. *Br Heart J* 1980;44:672-3.
- [Wienecke 2005] Wienecke H, Neumann T, Breuckmann F, Hunold P, Fries JWU. Non-Compaction-Kardiomyopathie. *Herz* 2005;6:571-574.
- [Wolf 2008] Wolf CM, Wang L, Alcalai R, et al. Lamin A/C haploinsufficiency causes dilated cardiomyopathy and apoptosis-triggered cardiac conduction system disease. *J Mol Cell Cardiol* 2008;44:293-303.
- [Worman 2007] Worman HJ, Bonne G. “Laminopathies”: a wide spectrum of human diseases. *Exp Cell Res* 2007;313:2121-2133.

Abbildungsverzeichnis

1.1	AHA-Klassifikation der Kardiomyopathien. Modifiziert nach [Maron 2006].	2
1.2	Makro- (A) mikroskopische (B) Gegenüberstellung eines gesunden und eines hypertropen Herzens (B, D). Deutlich ist die Hypertrophie des interventrikulären Septums (x) und der linken Ventrikelwand (*). (D) <i>Disarray</i> der Kardiomyozyten mit interzellulärer Fibrose (Aufhellungen) [Ahmad 2005].	3
1.3	(A) Humanes Sektionspräparat eines Herzens mit LVNC. Kompaktierte epikardiale-(x) und nicht-kompaktierte endokardiale Schicht(*). (B) Echokardiografischer Vierkammerblick. Dünne epikardiale Schicht(†) und ausgeprägte Trabekularisierung der endokardialen Schicht mit tiefen intratrabekulären Recessus(►). LA=linkes Atrium; LV=linker Ventrikel; RA=rechtes Atrium; RV=rechter Ventrikel [Oechslin 2000].	6
1.4	Diagnostik der LVNC. Chin et al: Verhältnis zwischen dem Abstand des Epikards zum tiefsten Punkt des Recusses (X) und dem Abstand des Epikards zur Trabekelspitze (Y). Jenni et al: Verhältnis zwischen der Dicke der nicht-kompaktierten (N) und kompaktierten Schicht (C). Modifiziert nach [Captur 2010]	8
1.5	Elektronenmikroskopisches Bild eines Kardiomyozyten mit den verschiedenen Kompartimenten der fDCM-Krankheitsgene [Dellefave 2010]. LMNA ist als eines der wichtigsten farbig hervorgehoben.	9
1.6	(A) Immunfluoreszenz-Aufnahme einer Zelle einer Rattenniere. Der Pfeil kennzeichnet die Kernhülle[Burke 2002]. (B) Elektronenmikroskopische Abbildung der Kernlamina und des Kernporenkomplex (NPC)[Broers 2006]. (C) Schematische Übersicht der Organisation der Kernhülle [Stewart 2007/1].	10
1.7	Gen- und Proteinstruktur von Lamin A/C einschließlich der einzelnen Proteindomänen. Modifiziert nach [Perrot 2009].	12
1.8	Stufen der Laminorganisation. (A) Lamindimer. (B) <i>head-to-tail</i> Polymere [Stuurman 1998]. (C) Parakristalline Struktur aus Zellen einer Rattenleber (in vitro) [Aebi 1986].	12
1.9	Übersicht der komplexen Interaktion von Lamin A/C. Grün - Einfluss auf die Zelldifferenzierung durch Interaktion mit verschiedenen TF. Rot - Beeinflussung der Funktion und Stabilität der Kernhülle und des Zytoskeletts. Blau - Einflussnahme auf verschiedene Zellvorgänge. Schwarz - direkte Interaktion. Weiß - indirekte oder unklare Interaktionen. † = Hemmung. [Broers 2006, Johnson 2004, Van Berlo 2005].	14
1.10	Klassifikation der Laminopathien [Worman 2007].	15

3.1	Ergebnis der Gelelektrophorese am Beispiel von Exon 9 mit Test-DNA (A, B, C, D, E, F). Die Größe des PCR-Produkts ist rot markiert. MVIII - Molekulargewichtsmarker, KN - negative Kontrolle.	26
4.1	Arbeitsablauf	31
4.2	Temperaturgradient für Exon 9. Die richtige Größe des PCR-Produkts ist rot gekennzeichnet. MVIII - Molekulargewichtsmarker, bp - Basenpaar, KN - negative Kontrolle.	32
4.3	Links - PCR-Ergebnis mit Test-DNA (K, L, M, N, O, P). Rechts - PCR-Ergebnis mit Patienten-DNA (1001, 1007, 1010, 1012). MVIII - Molekulargewichtsmarker, bp - Basenpaar, KN - negative Kontrolle.	32
4.4	PCR-Ergebnisse für Exon 8 ohne jegliche Zusätze, mit Test- (Q, R, S, T, U, V) und Patienten-DNA (1001, 1007, 1010, 1012, 1016, 1019, 1022). Das im Vorfeld ermittelte PCR-Produkt ist rot dargestellt (286 bp).MVIII - Molekulargewichtsmarker, bp - Basenpaar, KN - negative Kontrolle.	33
4.5	Zwischenschritte der PCR-Optimierung von Exon 8 mit Patienten- DNA (1001, 1007, 1010, 1012, 1016, 1019). Obere Abb. - Zusatz von DMSO. Untere Abb. - Zusatz von Betain. MVIII - Molekulargewichtsmarker, bp - Basenpaar, KN - negative Kontrolle.	34
4.6	Ergebnisse der optimierten PCR für Exon 8 mit 2.5 µL Betain, 2 µL Patienten-DNA (1001, 1007, 1010, 1012, 1016, 1019) und 38 Zyklen. MVIII - Molekulargewichtsmarker, bp - Basenpaar, KN - negative Kontrolle.	34
4.7	PCR-Ergebnis von Exon 12 mit Test-DNA (K, L, M) ohne Optimierung. Das PCR-Produkt ist rot markiert (686 bp). MVIII - Molekulargewichtsmarker, bp - Basenpaar, KN - negative Kontrolle.	35
4.8	PCR-Ergebnis von Exon 12 nach Abschluss der Optimierung. Die exakte Größe des PCR-Produkts ist rot hervorgehoben. MVIII - Molekulargewichtsmarker, bp - Basenpaar, KN - negative Kontrolle.	35
4.9	Temperaturgradienten für das Primerpaar 1.3. Links- ohne Betain. Rechts- mit Betain. Das PCR-Produkt ist rot markiert. MVIII - Molekulargewichtsmarker, bp - Basenpaar, KN - negative Kontrolle.	36
4.10	Ergebnis der Touchdown-PCR mit AmpliTherm-DNA-Polymerase.	36
4.11	Sequenzausschnitte des Endes von Exon 9 zum Vergleich der Sequenziererergebnisse mit dem <i>forward</i> (obere Leiste) und dem <i>reverse</i> (untere Leiste) Primer. Es wird deutlich, dass in diesem Bereich nur die forward-Sequenz auswertbar ist. Der Exonbereich ist gelb hinterlegt.	38

4.12 Gegenüberstellung der DNA-Sequenzen von Exon drei vor (obere Leiste) und nach (untere Leiste) der Optimierung des PCR-Produkts. Pfeile markieren schwer lesbare Stellen. . . . 38

4.13 Elektropherogramme von Exon 1. Gegenüberstellung des Wildtyps (obere Leiste; Probe 2577) und des SNP rs11549668 (untere Leiste; Probe 2573) an Position 51 (Pfeil). . . . 39

4.14 Sequenzausschnitt des Chromatogramms von Exon 2. Darstellung des SNPs rs41313880 an Position 357 der cDNA (untere Leiste; Patient 2530) im Vergleich zum Wildtyp (obere Leiste; Patient NC15). Beide sind durch eine Pfeil gekennzeichnet. 39

4.15 Vergleichende Darstellung der Elektropherogramme von Exon 3, einmal der Wildtyp (obere Leiste; Patient NC-37) und einmal der SNPs rs12117552 (untere Leiste; NC-23) an Position 612 der cDNA (Pfeil). 40

4.16 Elektropherogramme von Exon 5. Vergleich des Wildtyps (obere Leiste; Patient 2536) und des SNP rs538089 in hetero- (mittlere Leiste; Patient 2543) und homozygoter (untere Leiste; Patient NC-28) Form. Die Veränderung der Base an Position 861 der cDNA ist durch einen Pfeil markiert. 40

4.17 Gegenüberstellung der Elektropherogramme des SNP rs17847242 (unter Leiste; Patient NC-16) und des Wildtyps (obere Leiste; Patient 2707). Die Pfeile kennzeichnen Position 1017 der cDNA. 41

4.18 Intronischer SNP rs534807 (Heterozygote G/A mittlere Leiste; Homozygote A/A untere Leiste) im Vergleich zum Wildtyp (G/G obere Leiste). Die Pfeile markieren Position 16 nach Exon 6. 41

4.19 Ausschnitte der Elektropherogramme von Exon 7. Gegenüberstellung der heterozygoten (mittlere Leiste; Patient 2704) und homozygoten (untere Leiste; Patient 2696) Variante des SNP's rs505058 und des Wildtyps (obere Leiste; Patient 2708) an Position 1338 der cDNA (Pfeil) 42

4.20 Sequenzausschnitt der Elektropherogramme einer hetero- (mittlere Leiste; Patient 2695) und einer homozygoten (untere Leiste; Patient 2555) Variante des SNP rs4641 und des Wildtyps (obere Leiste; Patient 2522). Die betroffene Base in Exon 10 ist durch einen Pfeil gekennzeichnet. 42

4.21 Vergleichende Darstellung der Elektropherogramme des Wildtyps (obere Leiste; Patient NC-34) und der neu identifizierten Variante c.78C>T (untere Leiste; Patient 1254). Das betroffene Nukleotid an Position 78 der cDNA ist jeweils durch einen Pfeil markiert. . . 44

4.22	Ergebnisse der Sequenzierung des Wildtyps (obere Leiste; Patient 1254) im Vergleich zur Variante c.105G>C (untere Leiste; Patient NC-34). Die genaue Lokalisation der Veränderung ist durch einen Pfeil gekennzeichnet.	45
4.23	Gegenüberstellung der Sequenzausschnitte des Wildtyps (obere Leiste; Patient 2689) und der Mutation c.1751G>A (untere Leiste; Patient 1245) im Exon 11. Das betroffene Nukleotid ist durch einen Pfeil gekennzeichnet.	46
4.24	Sequenzausschnitte des Wildtyps (obere Leiste; Patient 1245) und der Variante c.1803C>T (untere Leiste; Patient 2689). Position 1803 der cDNA ist durch einen Pfeil markiert. . .	46
4.25	Ausschnitt der Elektropherogramme des Wildtyps (obere Leiste) gegenüber der intronischen Variante c.936+12C>T (untere Leiste).	47
4.26	Darstellung der <i>splice-sites</i> (gelb) in der Umgebung der neuen Variante mithilfe des Programms RESCUE-ESE. Alle Basen die zu Exon 5 gehören sind rot unterstrichen. Die betroffene Base aus Variante c.936+12C>T ist rot hinterlegt. Sie führt zu keine Veränderung einer <i>splice-site</i>	47
4.27	Sequenzausschnitte der Elektropherogramme des Wildtyps (obere Leiste; Patient NC-30) und der Mutation p.Ala441Val (untere Leiste; Patient 1213). Position zwei des Kodons 441 ist stets grau hinterlegt und durch einen Pfeil markiert.	48
4.28	Vergleich der Strukturformel von Alanin und Valin. Die Veränderung ist rot markiert. . .	49
4.29	Ergebnisse der Sequenzierung des Wildtyps (obere Leiste; Probe 2564) gegenüber denen der Mutation c.1634G>A (untere Leiste; Probe 1274). Die genaue Lokalisation an Position zwei des Kodons 545 ist grau hinterlegt und durch einen Pfeil kenntlich gemacht.	50
4.30	Strukturvergleich zwischen Arginin und Histidin. Die rote Farbe kennzeichnet den Unterschied zur Wildtyp-AS.	50
4.31	Gegenüberstellung der <i>two cut</i> Restriktionsenzyme des Wildtyps (obere Abbildung) und der <i>unique cutters</i> der Mutation p.Ala441Val (untere Abbildung). Der rote Kreis kennzeichnet die drei Restriktionsenzyme, die im Wildtyp zwei Schnittstellen besitzen, in der Mutante jedoch nur eine. Das verwendete Enzym für den RFLP ist rot hervorgehoben. Der Pfeil markiert die Position der Mutation (Position 190 im Exon 7).	52
4.32	3 %iges Agarosegel mit den Ergebnissen des Restriktionsverdaus. Während der Wildtyp zwei Restriktionsschnittstellen hat, liegt bei der Mutation eine Wildtypallel (zwei Schnittstellen) und ein mutiertes Allel (eine Schnittstelle) vor. MVIII-Molekulargewichtsmarker, PCR-unverdautes PCR-Produkt, M-Mutation, WT-Wildtyp.	53

4.33 *Cutmap* der *unique cutters* von Exon 10 nach Veränderung durch die Mutation c.1634G>A. Neu entstandene Restriktionsschnittstellen im betroffenen Codon sind rot eingekreist. Das verwendete Enzym ist rot hinterlegt. Der rote Pfeil markiert die Position (148) der Mutation im PCR-Produkt von Exon 10. 54

4.34 Ergebnisse des RFLP zwischen dem Wildtyp und der Mutation p.Arg545His. Die Größen der einzelnen Banden sind rot beschriftet. Deutlich erkennbar ist, dass durch die Mutation in einen Allel eine neue Restriktionsschnittstelle entsteht. MVIII-Molekulargewichtsmarker, PCR-unverdautes PCR-Produkt, M-Mutation, WT-Wildtyp. 55

4.35 Darstellung der gefundenen Varianten im LMNA Gen. Bekannte synonyme SNPs sind blau, neue synonyme Varianten grün und neu identifizierte Missens-Mutationen sind rot dargestellt. Nicht-synonyme Varianten sind zusätzlich innerhalb Proteinstruktur markiert. . . 55

5.1 Homologievergleich. Vergleich der AS-Sequenzen verschiedener Spezies für die Mutationen p.Ala441Val und p.Arg545His und deren Umgebung [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Homology/Homology.cgi?hid=41321>]. 61

5.2 *C-terminal domain* von Lamin A/C im Vergleich mit der *C-terminal domain* von anderen IF. Deutlich erkennbar, liegt die identifizierte Mutation p.A441V zwischen zwei hochkonservierten hydrophoben AS. Durch die Mutation wird das Kodon 441 selbst hydrophob und beeinflusst somit den hochkonservierten hydrophoben Bereich. Mutation p.R545H liegt außerhalb des hochkonservierten Bereichs. CONS - Zusammenfassung der AS die in den untersuchten IF eine Konservierung ≥ 60 % haben. Schwarze Sterne - hochkonservierte hydrophobe AS, rote Sterne - hochkonservierte polare AS. Modifiziert nach [Krimm 2002]. 62

5.3 Genstruktur von Vinculin mit den verschiedenen Proteindomänen und den Kardiomyopathie assoziierten Mutationen. Der Metavinculin spezifische Genabschnitt ist orange markiert. *Head-domain* von Vinculin - VhN/C, Vh1N/C und Vh2N/C. *Tail-domain* von Vinculin - Vt und Vt2. Rot - HCM-assoziierte Mutation, blau - DCM assoziierte Mutation, lila - HCM und DCM assoziierte Mutation. Modifiziert nach [Vasile 2006]. 67

- 5.4 Vergleich der krankheitsassoziierten Gene verschiedener KM mit den dazugehörigen Überlappungen. Von 29 Genen verursachen 17 mindestens zwei unterschiedliche Formen isolierter KM. Die KM-assoziierten Gene sind: Myosin-bindendes ProteinC (MYBPC3), β -Myosin schwere Kette (MYH7), α -Myosin schwere Kette (MYH6), kardiales Troponin T (TNNT2), kardiales Troponin I (TNNI3), kardiales Troponin C (TNNC1), kardiales Aktin (ACTC), α -Aktinin 2 (ACTN2), Titin (TTN), Titin-cap/ Telethonin (TEL), α -Tropomyosin (TPM1), regulatorische leichte Kette (MYL2), essenzielle leichte Kette (MYL3), Muskel LIM Protein (CSRP3), Myozenin 2 (MYOZ2), Myopalladin (MYPN), ATP-sensitiver Kaliumkanal (SUR2A/ABCC9), δ -Sarcoglycan (SGCD), Tafazzin (G4.5), Junctophilin 2 (JPH2), Calreticulin (CALR3), LIM bindende Domäne 3 (LDB3), Lamin A/C (LMNA), Metavinculin (VCL), Phospholamban (PLN), Dystrophin (DMD), Desmin (DES), Laminin α -4 (LAMA4), kardialer Natriumkanal (SCN5A). Modifiziert nach [Hershberger 2009, Perrot 2007] . . . 68

Tabellenverzeichnis

1	Übersicht aller verwendeten Chemikalien.	17
2	Geräteliste.	18
3	Sonstige verwendete Materialien.	19
4	Gradientenprogramm für den Thermocycler PTC-200 MJ TM	22
5	Standart-PCR-Ansatz.	24
6	Thermocyclerprogramm für die Standard-PCR.	24
7	Ansatz für die Touchdown PCR.	25
8	Thermocyclerprogramm für die <i>Touchdown</i> -PCR [Taylor 2004].	25
9	Ansätze für 3%ige Agarosegele.	26
10	Zusammensetzung des 5x TBE-Puffers.	26
11	Verwendete ddNTPs und ihre Fluoreszenzfarbstoffe.	27
12	Ansatz für die enzymatische Aufreinigung der PCR-Produkte.	28
13	Thermocyclerprogramm für die Enzymatische Aufreinigung.	28
14	Ansatz für die Sequenzierung.	29
15	Thermocyclerprogramm für das <i>cycle sequencing</i>	29
16	Ansätze für den Restriktionsverdau.	30
17	PCR-Bedingungen für Exon 2, 4, 5, 6, 7, 9, 10 und 11.	33

18	PCR-Bedingungen für Exon 3 und Exon 8.	34
19	PCR-Bedingungen für Exon 12.	35
20	PCR-Bedingungen für Exon 1.	36
21	Vergleich der Genotypenverteilung in den einzelnen Kollektiven mit geeigneten Referenzwerten.	43
22	Gegenüberstellung der Nukleotid- und AS-Sequenz des Wildtyps und der Mutante p.Ala441Val. Im Wildtyp ist die betroffene Region grün dargestellt. Im Gegensatz dazu, ist die Veränderung innerhalb der Mutante rot gekennzeichnet.	48
23	Übersicht der wichtigsten chemischen Eigenschaften von Alanin und Valin. Unterschiede sind rot hervorgehoben.	49
24	Messdaten der Echokardiographie von Patient 1213.	49
25	Übersicht der verschiedenen Nukleotid- und AS-Sequenzen des Wildtyps und der Mutation c.1634G>A. Position zwei im Kodon 545 (blau) und die kodierte AS sind im Wildtyp grün dargestellt, wohingegen die Veränderung in der Mutante rot hervorgehoben wird.	50
26	Vergleich der chemischen Eigenschaften von Arginin und Histidin. Unterschiede sind rot hervorgehoben.	51
27	Echokardiographische Daten von Patient 1274.	51
28	Tabellarische Übersicht über gefundene SNPs und Mutationen.	56
29	Übersicht über die HCM Krankheitsgene, deren Protein, Häufigkeit und vorrangiger Phänotyp [Bos 2009, Hershberger 2009, Kelly 2009, Keren 2008]	91
31	Übersicht der verwendeten Primer für Exon 1 bis 12.	92

A Anhang

A.1 Anhang HCM

Tabelle 29: Übersicht über die HCM Krankheitsgene, deren Protein, Häufigkeit und vorrangiger Phänotyp [Bos 2009, Hershberger 2009, Kelly 2009, Keren 2008]

Gene	Kodiertes Protein	Chromosomaler Lokus	Myokardstruktur	Phänotyp	Häufigkeit
MYH7	β -Myosin schwere Kette	14q11.2-q12	Myofilament	Milde-schwere HCM	25-35 %
MYBPC3	Myosin-bindendes Protein C	11p11.2	Myofilament	Siehe β -MHC, später Beginn	20-30 %
TNNT2	Kardiales Troponin T	1q32	Myofilament	Milde HCM, plötzlicher Herztod	3-15 %
TPM1	α -Tropomyosin	15q22.1	Myofilament	Variable Prognose, plötzlicher Herztod	< 5-15 %
TNNI3	Kardiales Troponin I	19p13.4	Myofilament	Intrafamiliär sehr heterogen	< 5 %
CSRP3	Kardiales Muskel LIM Protein	11p15.1	Z-Scheibe	Später Beginn, variable Penetranz	< 5 %
LBD3	LIM bindende Domäne 3	10q22.2-q23.3	Z-Scheibe	Hauptsächlich sigmoidale HCM	1-5 %
TCAP	Telethonin	17q12-q21.1	Z-Scheibe	Typische HCM, variable Penetranz	< 2 %
MYL2	Regulatorische leichte Kette	12q23-q24.3	Myofilament	Skelettmypathie	< 2 %
MYL3	Essentielle leichte Kette	3p21.2-p21.3	Myofilament	Skelettmypathie	< 1 %
ACTC1	α -Kardiales Aktin	15q14	Myofilament	Apikale Hypertrophie	< 1 %
TTN	Titin	2q24.3	Myofilament	Typische HCM	< 1 %
α -MHC	α -Myosin schwere Kette	14q11.2-q12	Myofilament	Später Beginn	< 1 %
TNNC1	Kardiales Troponin C	3p21.3-p14.3	Myofilament	Typische HCM	< 1 %
MYLK2	Myosin leichte Kettenkinase	20q11.21	Myofilament	Früher Beginn	< 1 %

VCL	Vinculin/ Metavinculin	10q22.1.q23.3	Z-Scheibe	Obstruktive Hypertrophie	< 1 %
ACTN2	α -Aktinin 2	1q42-q43	Z-Scheibe	Hauptsächlich sigmoidale HCM	< 1 %
PLN	Phospholamban	6q22.1	Ca-Stoffwechsel	Typische HCM, variable Penetranz	< 1 %
MYOZ2	Myozenin 2	4q21-q27	Z-Scheibe	Typische HCM	< 1 %
JPH2	Junctophilin	20q12	Ca-Stoffwechsel	Typische HCM	< 1 %
CALR3	Calreticulin 3	19p13.12	Endoplasmatisches Retikulum	/	selten
CAV3	Caveolin 3	3p25	Membranbestandteil	/	selten

A.2 Anhang Material Methoden

Tabelle 31: Übersicht der verwendeten Primer für Exon 1 bis 12.

Exon	Primer	Sequenz
1	F	5'...CCG AGC AGT CTC TGT CCT TC...3'
	R	5'...CCC TCT CAC TCC CTT CCT G...3'
2	F	5'...CAG ACT CCT TCT CTT AAA TCT AC...3'
	R	5'...CCT AGG TAG AAG AGT GAG TGT AC...3'
3	F	5'...CCT TCC AGT TCT TGT GTT CTG TGA C...3'
	R	5'...CCT AGC CCA GCC CAA GTC TGT C...3'
4	F	5'...GGC CTC CCA GGA ACT AAT TCT G...3'
	R	5'...CTC CCT GCC ACC ATC TGC...3'
5	F	5'...GCT GTA GCA GTG ATG CCC AAC...3'
	R	5'...CCA AAG CCC TGA GAA GTG AAG...3'
6	F	5'...GCC AGG ACT ATG TTT AGA GCT TG...3'
	R	5'...GGT CTA GTC AAG GCC AGT TG...3'
7	F	5'...CCC CAC TTG GTC TCC CTC TCC...3'
	R	5'...CCC TGA TGC AGC TGT ATC CCC...3'
8	F	5'...GAG GCC TCA ATT GCA GGC AGG C...3'
	R	5'...GAA AAG GAC ACT TAC CCC AGC...3'
9	F	5'...GGA GCG CTG GGG TAA GTG TC...3'
	R	5'...CTC GTC CAG CAA GCA GCC AG...3'
10	F	5'...GTA AGC AGC AGG CCG GAC AAA G...3'
	R	5'...CAC AGG AAT CCA TGG CAT C...3'
11	F	5'...CCT GAG TGG TCA GTC CCA GA...3'
	R	5'...ACC TCG TCC TAC CCC TCG AT...3'
12	F	5'...GGG GTG GCA GCT TCG GGG ACA ATC...3'
	R	5'...AGG GAA AAG GAA GGG AGG AGA AAT...3'

F-forward, R-reverse

Danksagung

In erster Linie danke ich meinem Doktorvater Herrn PD Dr. med. Cemil Özcelik für die Überlassung des hochinteressanten Themas, die Betreuung meiner Arbeit und die Aufnahme in sein Team. Mit seiner freundschaftlichen Art hatte er stets ein offenes Ohr für Probleme und Sorgen und half durch konstruktive Vorschläge diese zu lösen. Zudem motivierte er mich immer wieder das Ziel nicht aus den Augen zu verlieren.

Weiterhin möchte ich Herrn Andreas Perrot für die ausgezeichnete Betreuung im Labor danken. Durch kritisches Hinterfragen und seine fachkundige Hilfe, trug er einen großen Teil zum Gelingen dieser Arbeit bei. Ebenfalls danke ich dem gesamten Team des Kardiogenetischen Labors für die sehr gute Zusammenarbeit und die geduldige Einarbeitung in die molekulargenetischen Arbeitstechniken. Ich habe mich vom ersten Tag an als Teil des Teams gefühlt, danke dafür.

Besonderer Dank gilt Christoph Richter, der mich durch alle Höhen und Tiefen dieser Doktorarbeit begleitete, mir immer wieder Mut zusprach und mit seinem informationstechnischem Verständnis so manches Problem löste.

Nicht zuletzt möchte ich meinen Eltern, Kerstin und Jörg Neubert, danken, die mir durch ihr blindes Vertrauen und ihre bedingungslose Liebe das Selbstvertrauen gaben dieses Studium zu meistern. Ganz besonderen Dank dafür, dass Sie immer das Beste für meine Schwester und mich tun und alles Erdenkliche bereit sind, dafür zu geben.

Allen meinen lieben Freunden danke ich von Herzen für ausdauerndes Korrekturlesen, konstruktive Kritik und scheinbar endlose Geduld, womit sie mir stets zur Seite standen.

Lebenslauf

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

Publikationen

Poster

Diversity of cardiomyopathy phenotypes regarding lamin A/C: Novel LMNA mutations in hypertrophic cardiomyopathy

M Neubert, A Perrot, R Dietz, W Haverkamp, C Özcelik

ECCR Meeting 2011

Diversity of cardiomyopathy phenotypes regarding lamin A/C: a novel LMNA mutation in hypertrophic cardiomyopathy

A Perrot, **M Neubert**, R Dietz, MG Posch, C Özcelik

Heart Failure Congress 2010

Vorträge

Diversity of cardiomyopathy phenotypes regarding lamin A/C: Novel LMNA mutations in hypertrophic cardiomyopathy

A Perrot, **M Neubert**, R Dietz, MG Posch, C Özcelik

Frontiers in CardioVascular Biology 2010

Selbstständigkeitserklärung

“Ich, Maraike Neubert, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: “Genetische Analyse des LMNA-Gens, kodierend für Lamin A/C, bei Patienten mit Hypertropher Kardiomyopathie und Non-Compaction Kardiomyopathie” selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.”

Datum

Unterschrift