

Aus dem
CharitéCentrum für Frauen-, Kinder- und Jugendmedizin mit Perinatalzentrum und
Humangenetik
Klinik für Pädiatrie mit Schwerpunkt Kinderkardiologie
Direktor: Professor Dr. med. Felix Berger

Habilitationschrift

Sarkomere Proteine und genetisch bedingte Herzinsuffizienz

zur Erlangung der Lehrbefähigung
für das Fach Pädiatrie

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Dr. med. Sabine Klaassen
aus Berlin

Eingereicht: Januar 2009

Dekanin: Professor Dr. med. Annette Grüters-Kieslich

1. Gutachter:

2. Gutachter:

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen

1	Einleitung	5
2	Sarkomere Proteine und genetisch bedingte Herzinsuffizienz – Eigene Originalarbeiten –	7
2.1	Die Rolle der sarkomeren Proteine für die Myokardfunktion und -entwicklung	7
2.1.1	Veränderungen der Genexpression von Troponin I während der Ontogenese und bei Herzinsuffizienz	8
2.2	Neue chromosomale Loci für Kardiomyopathien	19
2.2.1	Techniken zur Genidentifikation bei monogenen Erkrankungen.....	21
2.2.1.1	Genetische Kartierung - Kopplungsanalyse	21
2.2.1.2	Mutationsanalyse von Kandidatengen.....	22
2.2.2	Ein neuer Genlocus für autosomal dominant vererbte linksventrikuläre Noncompaction des Myokards (LVNC) auf Chromosom 11p15	23
2.2.2.1	Klinische Charakterisierung der Familie LVNC-105	23
2.2.2.2	Nachweis von Kopplung der LVNC an Chromosom 11p15.....	24
2.2.2.3	Charakterisierung des kritischen genomischen Bereichs auf Chromosom 11p15 und Kandidatengenanalyse.....	25
2.2.3	Ein neuer Genlocus für dilatative Kardiomyopathie, diffuse myokardiale Fibrose und plötzlichem Herztod auf Chromosom 10q25.....	31
2.3	Linksventrikuläre Noncompaction des Myokards (LVNC).....	40
2.3.1	Klinisches Bild der LVNC.....	40
2.3.2	Die LVNC als autosomal dominante Erkrankung.....	43
2.3.3	Kandidatengenscreening bei Indexpatienten mit isolierter LVNC	51
2.3.4	Mutationen in Genen, die für sarkomere Proteine kodieren, lösen LVNC aus	53
2.3.4.1	Mutationen in <i>MYH7</i>	53
2.3.4.2	Mutationen in <i>ACTC</i>	54
2.3.4.3	Mutation in <i>TNNT2</i>	55
3	Diskussion	65

3.1 Myokardiales Remodeling der unterschiedlichen Kardiomyopathien.....	65
3.2 LVNC als Defekt der Herzentwicklung.....	66
3.3 Genetische Kartierung.....	67
3.4 Klinische Bedeutung.....	68
3.5 Ausblick.....	68
4 Zusammenfassung.....	70
5 Literaturverzeichnis.....	72
Anhang.....	79
Danksagung.....	79
Eidesstattliche Versicherung.....	80

Abkürzungen

<i>ACTC</i>	α -Cardiac actin
AHA	American Heart Association
<i>BMP10</i>	bone morphogenic protein 10
cM	centiMorgan
DCM	Dilatative Kardiomyopathie
DHPLC	Denaturing High Performance Liquid Chromatography
G4.5/TAZ	Taffazin
HCM	Hypertrophe Kardiomyopathie
<i>LMNA</i>	LaminA/C
LOD	Logarithm of the odds
LVNC	Linksventrikuläre Noncompaction des Myokards
Mb	Megabasen
MLP/CSRP3	Muscle LIM Protein
<i>MYH7</i>	β -Myosin heavy chain
<i>MYL2</i>	Myosin regulatory light chain
<i>MYL3</i>	Myosin essential light chain
<i>Nkx2.5</i>	NK2 transcription factor related, locus 5
STR	Short Tandem Repeat
<i>TNNI3</i>	Troponin I
<i>TNNT2</i>	Cardiac Troponin T
<i>ZASP/LDB3</i>	z-band alternatively spliced pdz motif-containing protein

1 Einleitung

Die Herzinsuffizienz ist ein komplexer pathophysiologischer Zustand, bei dem die Zufuhr von Blut und Nährstoffen inadäquat für den Bedarf des Gewebes ist. Es besteht ein Unvermögen des Herzens, das vom Körper benötigte Herzzeitvolumen ohne Anstieg des enddiastolischen Füllungsdruckes zu fördern. Die wesentlichen Ursachen der Herzinsuffizienz sind kardiovaskuläre Erkrankungen wie koronare Herzerkrankung, Herzklappenerkrankungen, angeborene Herzfehler oder Erkrankungen, die primär von der Herzmuskulatur ausgehen, die Kardiomyopathien. Viele primäre Kardiomyopathien sind monogene Erkrankungen, bei denen Mutationen in einzelnen Genen zur Herzinsuffizienz führen (Ahmad et al. 2005; Maron et al., 2006). Untersuchungen der genetischen Ursachen der Herzinsuffizienz können dazu dienen, allgemeinere molekulare Mechanismen der myokardialen Dysfunktion aufzuklären.

Die früheste klinische Manifestation einer genetischen Ursache für Herzinsuffizienz ist das ventrikuläre Remodeling. Im Wesentlichen tritt dabei eine von zwei verschiedenen Morphologien auf: eine linksventrikuläre Hypertrophie oder die linksventrikuläre Dilatation (Abb. 1). Die klinische Diagnose kann entweder zur Diagnose der hypertrophen Kardiomyopathie (HCM) oder der dilatativen Kardiomyopathie (DCM) führen. Bei der HCM liegt eine vergrößerte linksventrikuläre (LV)-Wanddicke ohne LV-Vergrößerung vor. Die systolische Funktion ist normal, aber die diastolische Relaxation ist beim hypertrophen Remodeling vermindert. Bei der DCM findet sich eine normale oder verminderte Wanddicke bei vergrößerten LV-Dimensionen. Eine verminderte systolische Funktion charakterisiert das dilatative Remodeling. Beiden Erkrankungen, der HCM und DCM, können eine Vielzahl verschiedener Genmutationen zugrunde liegen. Dabei kommt den sarkomeren Proteinen eine zentrale Rolle zu. Mutationen in Genen, die für sarkomere Proteine kodieren, können interessanterweise sowohl zur HCM als auch zur DCM führen. Obwohl die Progression zur Herzinsuffizienz bei beiden Typen des Remodelings stattfindet, sind die Histopathologie, die Hämodynamik und die biophysikalischen Konsequenzen der Mutationen bei HCM und DCM verschieden und es ist anzunehmen, dass unterschiedliche molekulare Prozesse am Erkrankungsprozess beteiligt sind (Kamisago et al., 2000).

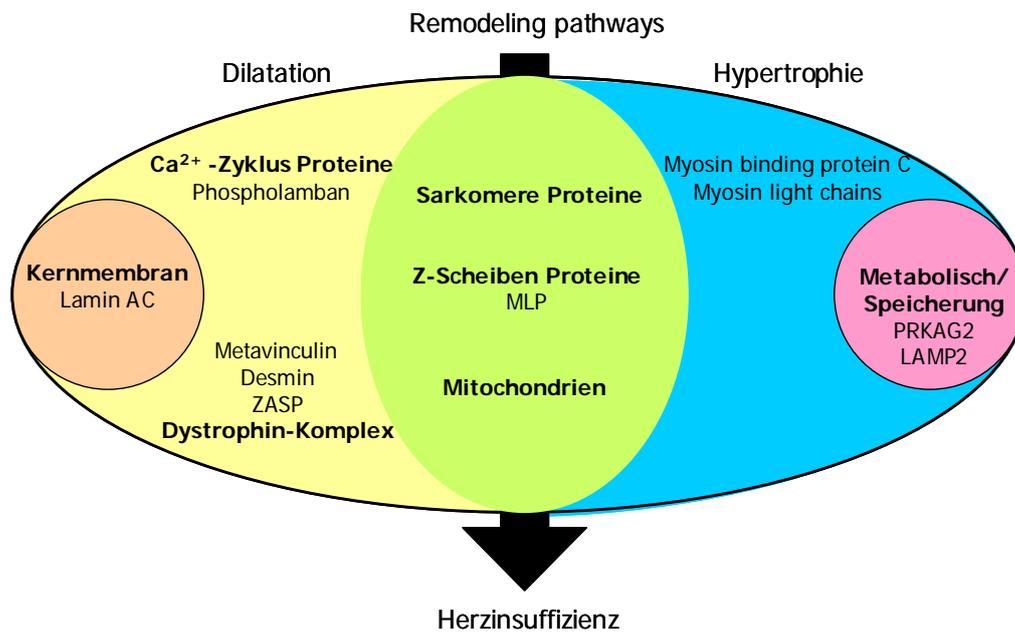


Abb. 1. Verschiedene Remodeling pathways führen zur Herzinsuffizienz (verändert nach Morita et al., 2005)

Ziele der in der Habilitationsschrift vorgelegten wissenschaftlichen Arbeiten waren:

- a) Untersuchungen zur Rolle der sarkomeren Proteine für die Myokardfunktion und- entwicklung
- b) Die Identifizierung von neuen Genloci für Kardiomyopathien
- c) Die Aufklärung von molekulargenetischen Ursachen der linksventrikulären Noncompaction des Myokards (LVNC), einer primären, angeborenen Kardiomyopathie

2 Sarkomere Proteine und genetisch bedingte Herzinsuffizienz – Eigene Originalarbeiten –

2.1 Die Rolle der sarkomeren Proteine für die Myokardfunktion und - entwicklung

Kraftentwicklung und deren Weiterleitung an die extrazelluläre Matrix sind die wesentlichen Aufgaben der Herzmuskelzelle. Ein Defizit in einem der Bestandteile dieses Prozesses führt zu kardialem Remodeling (Hypertrophie oder Dilatation) und zur Herzinsuffizienz. Da diese Prozesse wesentlich für die normale Herzfunktion sind, ist es naheliegend, dass auch besonders viele Mutationen in Genen gefunden wurden, die für Proteine kodieren, die in die myokardiale Kraftentwicklung und deren intrazellulärer Weiterleitung involviert sind.

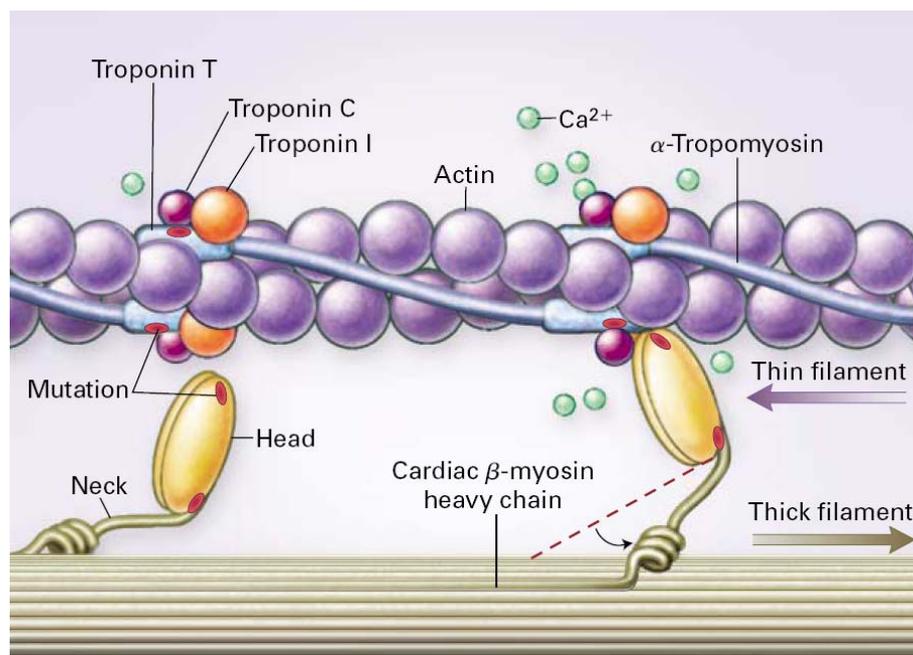


Abb. 2. Proteine, die an der Kraftentwicklung im Sarkomer beteiligt sind. Die Muskelkontraktion entsteht, wenn Calcium an den Troponin-Komplex (Untereinheiten I, C und T) und α -Tropomyosin bindet und die Hemmung der Myosin-Aktin Interaktion durch Troponin I aufgehoben wird. Die ATPase des Myosins wird durch Actin aktiviert und es resultiert in eine Konformationsänderung, bei der die Myosinköpfe an den Aktinfilamenten entlanggleiten (nach Kamisago et al., 2000, mit Genehmigung).

Ursache für eine autosomal dominante hypertrophe Kardiomyopathie (HCM) können Mutationen in 11 Genen sein, die in erster Linie für sarkomere Proteine kodieren (Thierfelder et al., 1994; Richard et al., 2003; Ahmad et al., 2005): β -Myosin heavy

chain (*MYH7*), Myosin essential light chain (*MYL3*), Myosin regulatory light chain (*MYL2*), Cardiac Troponin T (*TNNT2*), Troponin I (*TNNI3*), Troponin C (*TNNC1*), α -Tropomyosin (*TPM1*), α -Cardiac actin (*ACTC*), Cardiac Myosin binding protein C (*MYBPC3*), Titin (*TTN*) und MLP (*CSRP3*, nicht-sarkomer) (s. Abb.2, Abb.5).

Die autosomal dominant vererbte dilatative Kardiomyopathie (DCM) ist nach dem heutigen Erkenntnisstand durch Mutationen in über 20 verschiedenen Genen und chromosomalen Erkrankungsloci verursacht (Maron et al., 2006). Krankheitsverursachende Gene kodieren unter anderem für kontraktile, zytoskelettale und Calcium-regulierende Proteine (Ahmad et al., 2005). Mutationen in *MYH7* treten trotz der großen genetischen Heterogenität bei idiopathischer DCM am häufigsten auf und gelten in 10% der Fälle als krankheitsverursachend (Villard et al., 2005).

Demnach liegen dem kardialen Remodeling bei HCM und DCM zu einem wesentlichen Anteil Mutationen in einzelnen Genen, die für sarkomere Proteine kodieren, zugrunde. Nicht nur die genannten Mutationen, sondern auch Isoformübergänge sarkomerer Proteine, insbesondere die Reexpression des fetalen Genprogrammes können die funktionellen Eigenschaften des Myokards verändern. Unsere Untersuchungen zur Troponin I Genexpression während der Entwicklung des menschlichen Herzens und bei terminaler Herzinsuffizienz gehören zu den ersten, am menschlichen Herzen durchgeführten Studien zum Nachweis der bereits im Tiermodell bekannten Isoformübergänge.

2.1.1 Veränderungen der Genexpression von Troponin I während der Ontogenese und bei Herzinsuffizienz

Während der Ontogenese erfolgen Veränderungen der Genexpression sarkomerer Proteine (Abb3). Dabei ist das kardiale Wachstum durch das speziesspezifische Auftreten von verschiedenen Isoformen myokardialer Proteine gekennzeichnet (Boheler et al., 1991, Hailstones et al., 1992). Im hypertrophierten Myokard findet eine geänderte Synthese von Proteinen statt, die in verschiedenen Mechanismen bestehen (Izumo et al., 1988). Diese Untersuchungen waren jedoch hauptsächlich an kleinen Säugetieren durchgeführt worden:

- a) Generelle Aktivierung der myokardialen Genexpression

- b) Verminderte oder vermehrte Expression von Isoformen herzmuskelspezifischer kontraktiler Proteine
- c) Expression von Isoformen kontraktiler Proteinen, die nicht herzmuskelspezifisch sind
- d) Aktivierung von einzelnen Genen, die für nicht-kontraktile Proteine kodieren

Der Troponin-Komplex ist an der zellulären Antwort auf die Freisetzung von Calcium im Myokard und damit an der Regulation von Muskelkontraktibilität und-relaxation beteiligt. Das Vorkommen verschiedener Isoforme von Troponin und deren Zusammensetzung im Sarkomer stehen im Zusammenhang mit adrenerger Innervation und Muskelkontraktibilität. Es sind drei verschiedene Troponin I-Isoforme bekannt, die mit fast skeletal Troponin I (TnIf), slow skeletal muscle Troponin I (TnIs) und cardiac Troponin I (TnIc) assoziiert sind. TnIc besitzt im Gegensatz zu TnTs einen Aminoterminus, der durch adrenerge Stimulierung phosphoryliert wird und auf diese Weise ein direkter Einfluß auf die Geschwindigkeit der Relaxation des Myokards ausgeübt wird.

Es wurde das Muster der Genexpression der Isoforme von Troponin I im menschlichen Myokard während der fetalen und postnatalen Entwicklung bestimmt und versucht, diese in Beziehung zu möglichen entwicklungsbedingten physiologischen Veränderungen des Herzens zu setzen. Wir bestimmten den genauen zeitlichen Übergang von TnIs zu TnIc im menschlichen Herzen durch eine Kombination von Proteinuntersuchungen (Western blots) und RNA-Untersuchungen (Northern blots).

Das TnIc Isoform liegt auf Proteinebene in der Fetalzeit nur minimal vor und erst zum Zeitpunkt der 38. Gestationswoche erfolgt eine signifikante Erhöhung, die sich in der Neugeborenenperiode fortsetzt. Das TnIs Isoform dominiert während während der gesamten fetalen Entwicklung, fällt nach der Geburt ab und ist mit 9 Monaten postnatal mittels Western blot im Herzen nicht mehr nachweisbar. Auf mRNA-Ebene liegen mittels Northern blot sowohl TnIc als auch TnIs schon in der frühen fetalen Entwicklungsphase vor. Mit 9 Monaten postnatal ist, wie schon das korrespondierende Protein, die mRNA für TnIs nicht mehr nachweisbar. Die mRNA für TnIc zeigt einen sehr langsamen, graduellen Anstieg in der Fetalzeit und einen deutlichen Anstieg nach der Geburt. Die Protein-Isoforme und die

korrespondierenden mRNAs folgen demselben Schema, was durch eine Regulation der Isoforme auf Transkriptionsebene zu erklären ist. Der Übergang der Isoforme von TnIs zu TnIc, der um den Zeitpunkt der Geburt noch nicht abgeschlossen ist, kann ursächlich im Zusammenhang mit einer beschriebenen verminderten Ansprechbarkeit des neonatalen Myokards auf beta-adrenerge Stimulierung stehen.

Da im Tiermodell bestimmte Gene, die während der fetalen Entwicklung exprimiert sind, bei experimenteller Myokardhypertrophie und Herzinsuffizienz reexprimiert werden, testeten wir, ob bei Troponin I Veränderungen stattfinden. Wir untersuchten links- und rechtsventrikuläre Myokardproben von Patienten mit terminaler Herzinsuffizienz aufgrund von primärer pulmonaler Hypertonie, dilatativer Kardiomyopathie oder koronarer Herzerkrankung. In keiner dieser Gewebeproben war TnIs mRNA nachweisbar. Dies bedeutet, dass Veränderungen in der Troponin I-Genexpression nicht zur verminderten myokardialen Kontraktilität bei herzinsuffizienten Patienten, auch bei Kardiomyopathien, beitragen.

Diese Untersuchungen gehörten zu den ersten, am menschlichen Herzen durchgeführten Studien zum Nachweis der bereits im Tiermodell bekannten ontogenetischen Isoformübergänge (Sasse et al., 1993). Außerdem lieferten die Daten erste Hinweise, dass im menschlichen insuffizienten Herzen der Übergang zu dem fetalen Isoform eines sarkomeren Proteins bei der Entwicklung der Herzinsuffizienz kein generell gültiger Mechanismus ist. Dies wurde im weiteren für andere Bestandteile des dünnen Filaments bestätigt: α -cardiac und α -skeletal actin, α -tropomyosin, troponin C und troponin T.

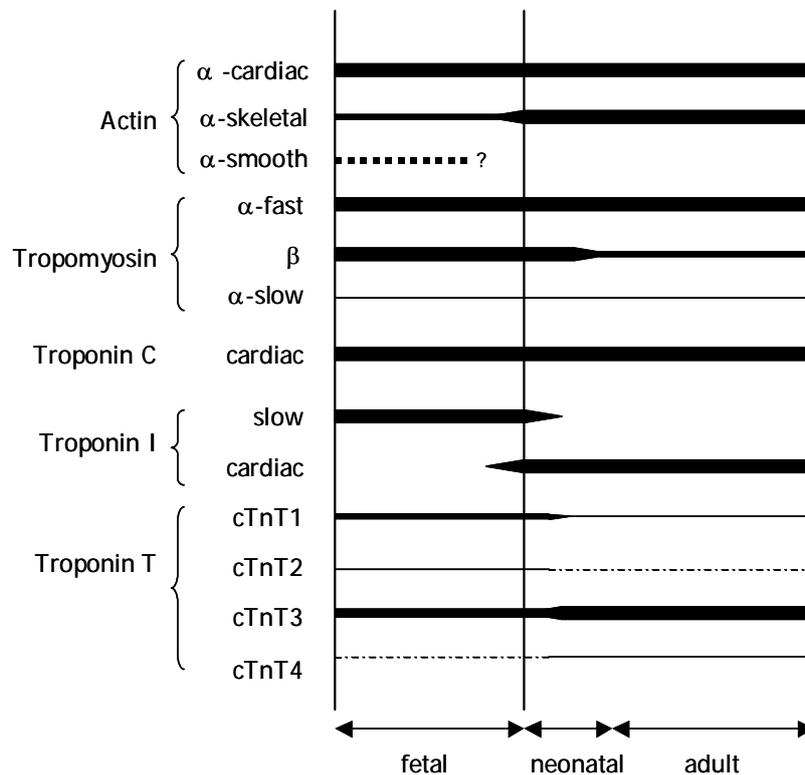


Abb. 3. Darstellung der Veränderungen der Zusammensetzung der Isoforme von Actin, Tropomyosin und Troponin während der Entwicklung vom Fetus zum Erwachsenen im menschlichen Myokard (verändert nach Marston et al. 2003)

Das Muster der Isoformexpression der genannten sarkomeren Proteine des dünnen Filaments wird bei Ischämie oder DCM im menschlichen Herzen nicht verändert (Marston et al., 2003). Im menschlichen Herzen beschränken sich die Isoformübergänge sarkomerer Proteine bei Hypertrophie demnach auf das dicke Filament, insbesondere auf die Myosinleichtketten (Morano JMM, 1999). Bei Myokardhypertrophie und Herzinsuffizienz tragen die Troponine nicht über die Reexpression fetaler Isoforme zu Änderungen in der myokardialen Funktion bei.

Originalarbeit 1

Troponin I gene expression during human cardiac development and in end-stage heart failure

Sasse S, Brand NJ, Kyprianou P, Dhoot GK, Wade R, Arai M, Periasamy M, Yacoub MH, Barton PJR

Circ Res 1993; 72:932-938

Seiten 12-18

2.2 Neue chromosomale Loci für Kardiomyopathien

Nach der neuesten Klassifikation der Kardiomyopathien der American Heart Association (Maron et al., 2006) wurden die Kardiomyopathien anhand der Erkenntnisse, die aus der Molekulargenetik gewonnen wurden, neu eingeteilt. So bestehen Kardiomyopathien aus einer heterogenen Gruppe von Erkrankungen des Myokards, die mit mechanischer und/oder elektrischer Dysfunktion assoziiert sind, in den meisten Fällen auch mit ventrikulärer Hypertrophie oder Dilatation. Die Ursachen sind vielfältig, jedoch liegt häufig eine genetische Ursache vor. Es werden nach der hauptsächlichen Organbeteiligung zwei wesentliche Gruppen unterschieden: Als primäre Kardiomyopathien gelten jene, bei denen vorwiegend der Herzmuskel betroffen ist. Die sekundären Kardiomyopathien weisen eine Beteiligung des Myokards als Teil einer generalisierten Erkrankung auf. Die primären Kardiomyopathien werden nach ihrer Ätiologie in „genetische, gemischte und erworbene Kardiomyopathien“ eingeteilt (Abb. 4).

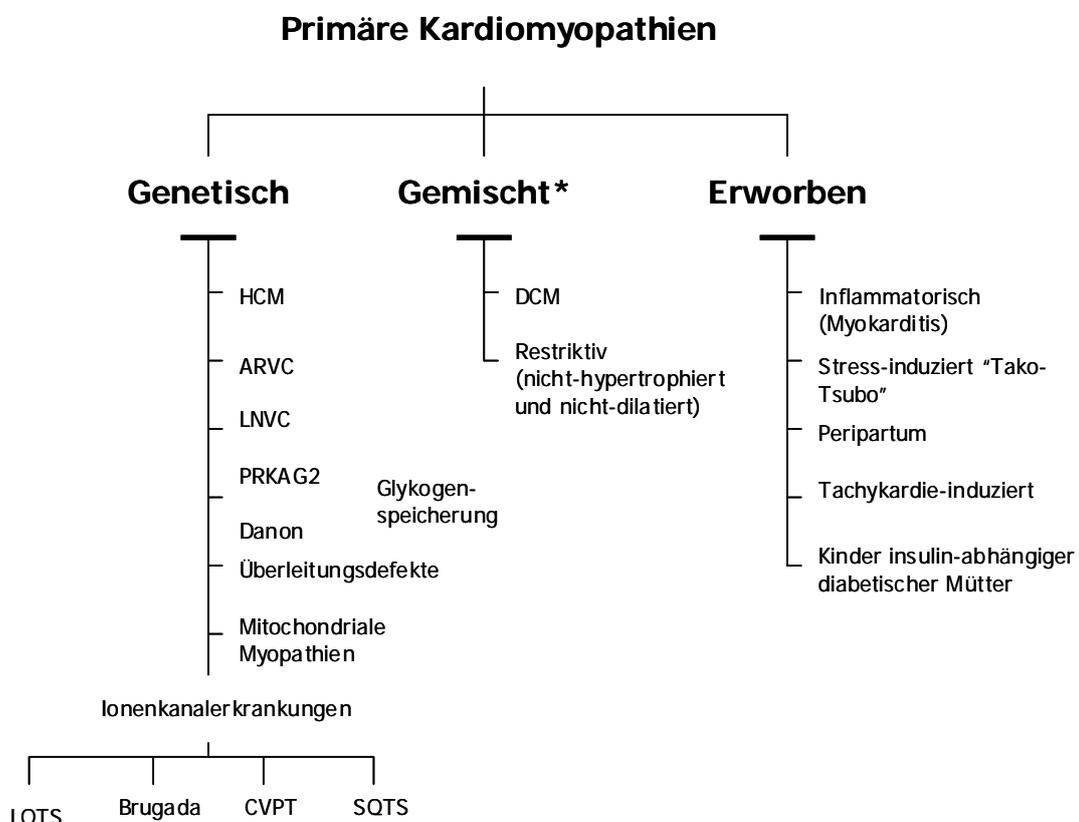


Abb. 4. Primäre Kardiomyopathien, bei denen der klinisch relevante Erkrankungsprozess vorwiegend das Myokard betrifft. Die Einteilung erfolgt anhand

der Ätiologie, genetisch oder nicht-genetisch. *gemischt: Vorwiegend nicht-genetisch; familiäres Auftreten der Erkrankung wird beobachtet (verändert nach Maron et al., 2006).

Eine Vielzahl von Genen ist an der Entstehung von Kardiomyopathien beteiligt (Towbin et al., 2002; Ahmad et al., 2005). Krankheitsgene, die zu DCM führen, sind unter anderem die Gene für zytoskelettale Proteine wie Dystrophin, Desmin und β - und δ -Sarcoglycan.

Mutationen in einem Teil der Gene, die für sarkomere Proteine kodieren, können sowohl zur DCM als auch zur HCM führen: β -Myosin heavy chain, cardiac Troponin T, α -Tropomyosin, α -Cardiac actin und Titin.

Dagegen sind Mutationen in den folgenden Genen, die für sarkomere Proteine kodieren, nur für HCM beschrieben worden: Myosin essential light chain, Myosin regulatory light chain, Troponin I, Troponin C und Cardiac Myosin binding protein C.

Als erstes Krankheitsgen für autosomal dominante linksventrikuläre Noncompaction des Myokards (LVNC) wurde α -dystrobrevin, ein weiteres zytoskelettales Protein beschrieben (Ichida et al., 2001).

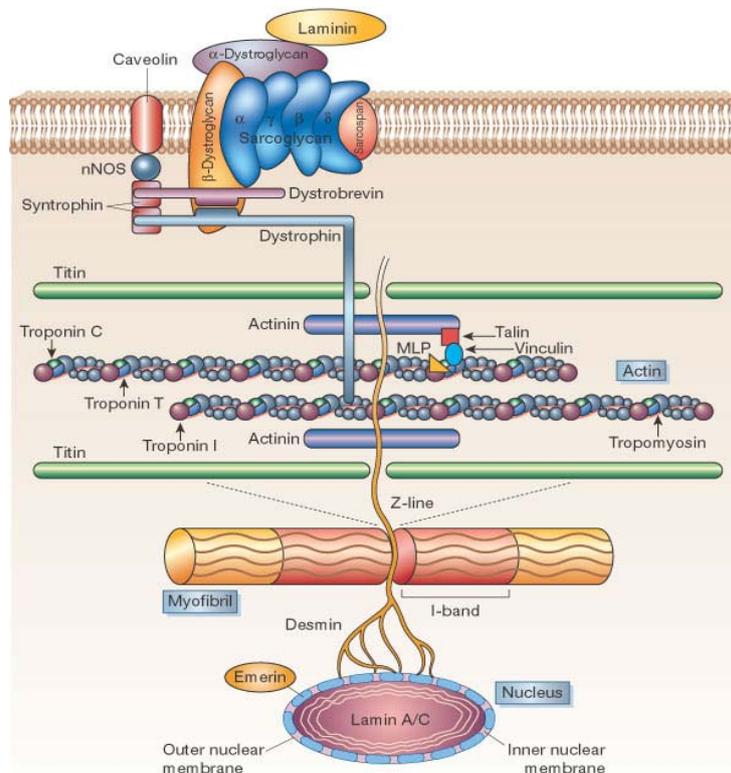


Abb. 5. Proteine und Zellkomponenten, die an der Entstehung von Kardiomyopathien beteiligt sind. Towbin et al., Nature (2002) mit Genehmigung.

Im Folgenden werden zwei Arbeiten zur Identifizierung von neuen Genloci für LVNC und DCM vorgestellt. Die molekulargenetischen Ursachen der LVNC waren bis vor kurzem noch weitgehend unklar und die Untersuchungen zur LVNC sind in Kapitel 3.3 noch detaillierter dargestellt. Wir untersuchten eine Familie mit autosomal dominant vererbter isolierter LVNC. In einer großen Familie mit autosomal dominanter DCM sollte außerdem das genetische Krankheitsintervall und ein neues DCM-Gen identifiziert werden. Trotz der Vielzahl der identifizierten Krankheitsgene für die DCM, gibt es bisher kein häufiges Krankheitsgen und die genetische Ursache wird in der Mehrzahl der Fälle nicht gefunden (Villard et al., 2005). Die Kopplungsanalyse in einem großen Stammbaum dient der Identifizierung von Krankheitsgenen. Die molekularen Mechanismen der myokardialen Dysfunktion bei Patienten mit Kardiomyopathie können anhand der Identifikation dieser Krankheitsgene aufgedeckt werden.

2.2.1 Techniken zur Genidentifikation bei monogenen Erkrankungen

Die Ursache monogener Erkrankungen ist eine einzelne genetische Veränderung, im Gegensatz zu polygen oder multifaktoriell bedingten Erkrankungen. Monogene Erkrankungen folgen den Mendelschen Gesetzen und haben einen dominanten oder rezessiven Erbgang und sind autosomal oder geschlechtschromosomal gebunden. Bei genetisch bedingten Erkrankungen können unterschiedliche molekulare Defekt vorliegen. Es kommen chromosomale Abberationen, Deletionen, Insertionen und Duplikationen einzelner Exons und Punktmutationen vor. Die Punktmutationen können in kodierenden Exons liegen und zu Aminosäuresubstitutionen oder Leserahmenverschiebungen (frame shifts) führen oder sich in nicht-kodierenden Bereichen befinden und das Spleißen oder die Regulation der Expression von Genen beeinflussen (Schönberger et al., 2005).

2.2.1.1 Genetische Kartierung - Kopplungsanalyse

Für die Ermittlung der genetischen Ursache monogener Erkrankungen bei Familien wird die Kopplungsanalyse verwendet. Grundvoraussetzung für eine erfolgreiche Kopplungsanalyse ist eine Familie mit einem großen Stammbaum über mehrere Generationen. Bei der Kopplungsanalyse bedient man sich der Tatsache, dass (Krankheits-)Gene und STR-Polymorphismen (Short Tandem Repeats) gemeinsam vererbt werden, wenn sie auf einem Chromosomenabschnitt dicht beieinander liegen. Ist die Erkrankung in einer Familie nicht mit einem bekannten Genort gekoppelt, wird

eine genomweite Kopplungsanalyse durchgeführt. Konnte ein STR-Polymorphismus identifiziert werden, bei dem ein Allel in der Familie mit der Erkrankung kosegregiert, kann durch Feinkartierung der krankheitsassoziierte Bereich, mit den darin enthaltenen Genen, eingeengt werden. Genetische Grundlage für die Kartierung sind homologe Rekombinationen. Während der Meiose können homologe Chromosomen bestimmte Abschnitte austauschen (Crossing-over). Diese Rekombinationsereignisse führen zum Austausch von Allelen, was in einem veränderten Haplotyp der Individuen sichtbar wird. Je enger Gen und STR-Polymorphismus beieinander liegen, desto seltener werden diese durch Rekombinationsereignisse getrennt. Rekombinationen von STR-Polymorphismen bei Familienmitgliedern kennzeichnen die Grenzen des krankheitsassoziierten Bereiches in dieser Familie, da die STR-Polymorphismen weiter entfernt vom Krankheitsgen liegen und nicht mit ihm im Zusammenhang stehen.

2.2.1.2 Mutationsanalyse von Kandidatengen

Im durch Kopplungsanalyse definierten Krankheitsintervall werden alle darin enthaltenen Kandidatengene einer Mutationsanalyse unterzogen. Eine Kandidatengenanalyse kann auch für Gene durchgeführt werden, die aufgrund ihrer biologischen Funktion für eine bestimmte Erkrankung als krankheitsverursachend angenommen werden können. Für alle Kardiomyopathien sind bereits verschiedene Gene bekannt, bei denen molekulare Defekte krankheitsverursachend sind. Die Fragestellung der Häufigkeitsverteilung von Mutationen in diesen Kandidatengen kann durch Mutationsanalyse in einem Patientenkollektiv untersucht werden. Dabei kann es sich zeigen, dass in bestimmten Genen sehr oft oder nur selten die Ursache zu finden ist. Diese Erkenntnisse sind für mögliche genetische Screenings bei Patienten von Bedeutung. Um die Mutation in Kandidatengen oder im krankheitsassoziierten Locus zu finden, wird in den meisten Fällen eine direkte Sequenzierung der Exons von ausgewählten Genen durchgeführt. Eine andere Möglichkeit um Sequenzunterschiede zu detektieren ist die Methode der DHPLC (Denaturing High Performance Liquid Chromatography, Oefner et al., 1995). Dabei werden eine Ionenpaar-Umkehrphasen-Chromatographie und das unterschiedliche Schmelzverhalten von homomeren und heteromeren PCR-Produkten kombiniert, um DNA-Fragmente mit Sequenzabweichungen zu erkennen.

Die Verwendung bioinformatischer Methoden ist ein wichtiger Bestandteil der Vorhersage von möglichen Kandidatengenomen. Die Weiterentwicklung von bioinformatischen Methoden erlaubt eine immer stärkere in silico-Interpretation durch die Auswertung der bisher gesammelten Datenmengen.

2.2.2 Ein neuer Genlocus für autosomal dominant vererbte linksventrikuläre Noncompaction des Myokards (LVNC) auf Chromosom 11p15

2.2.2.1 Klinische Charakterisierung der Familie LVNC-105

Die klinischen Untersuchungen im Vorfeld der genetischen Analyse von Blutproben individueller Mitglieder der Familie LVNC-105 wurden durch die kooperierende kardiologische Abteilung des Universitätsspitals Zürich durchgeführt. Die Diagnose LVNC wurde anhand der Kriterien von Jenni et al., 2001, gestellt. Die Familie LVNC-105, bestehend aus 33 Personen (14 männlich, 19 weiblich), ist schon 2003 von uns beschrieben worden und wurde vor der genetischen Kopplungsanalyse erneut evaluiert (Sasse-Klaassen et al., 2003). In neun Fällen wurde eine LVNC diagnostiziert. Dreimal wurde der Phänotyp als partiell penetrant eingestuft (III-7, III-12 und IV-12) und die übrigen 21 Familienmitglieder waren nicht betroffen (Abb.6).

LVNC-105

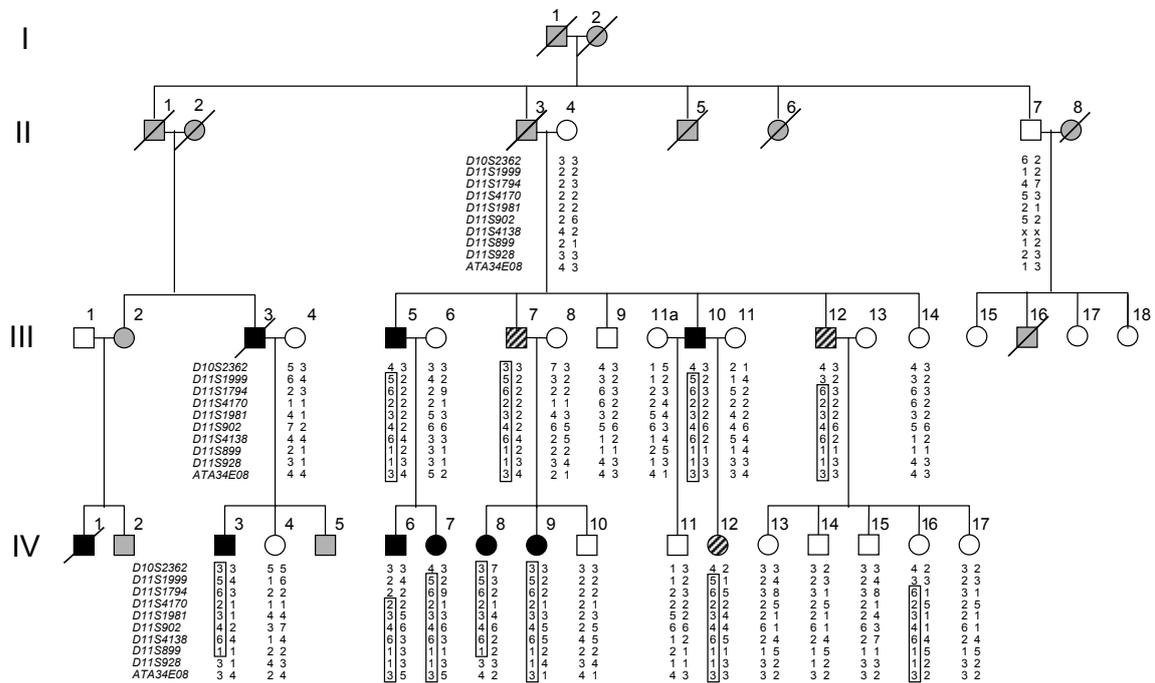


Abb. 6. Stammbaum der Familie LVNC-105, wie er für die Kopplungsanalysen verwendet wurde, mit Chromosom 11p15 Haplotypen: Betroffene (schwarz gefüllt), Unbetroffene (weiß gefüllt), Patienten mit partiell penetrantem Phänotyp (schraffiert gefüllt), unbekannter klinischer Status (grau gefüllt), Viereck (männlich), Kreis (weiblich), durchgestrichen (verstorben). Die römischen Zahlen bezeichnen die Generation, die arabischen Zahlen sind den einzelnen Personen dieser Generation zugeordnet. Die Zahlenanordnungen stellen zehn verschiedene Mikrosatellitenmarker dar, welche von Telomer (oben) zu Zentromer (unten) angeordnet sind. Die Krankheits-Haplotypen sind eingerahmt.

2.2.2.2 Nachweis von Kopplung der LVNC an Chromosom 11p15

Ziel der genetischen Analyse war es zunächst, einen Krankheitslokus für die im Vorfeld beschriebene Familie LVNC-105 zu detektieren. Zur genetischen Analyse stand die genomische DNA von 27 Familienmitgliedern zur Verfügung. Es wurde eine genomweite Analyse mit 447 hoch-polymorphen Mikrosatellitenmarkern mit einem durchschnittlichen Abstand von 10 cM nach der Marshfield-Genkarte durchgeführt. Für die Berechnungen wurden ein autosomal dominanter Vererbungsmodus sowie eine Krankheitspenetranz von 0.75-0.90 bei Betroffenen (0.5 bei partiell penetrantem Phänotyp) angenommen.

Signifikant positive Zwei-Punkt-LOD-Werte (LOD: logarithm of odds) zeigten sich nur für Marker des Chromosomabschnitts 11p15. Der Multipunkt-LOD-Wert hatte den höchsten Wert ($Z=5.15$) beim Marker D11S902. Wiederholte Analysen mit unterschiedlicher Penetranz waren ohne wesentlichen Einfluss auf das oben genannte Ergebnis. Als Genlokus konnte ein Intervall von 6.4 centiMorgan (cM) eingegrenzt werden, welches einer physikalischen Größe von 6.8 Megabasen (Mb) entspricht. Das distale Ende wird dabei durch eine Rekombination von D11S1794 bei Person IV-6 definiert. Das proximale Ende wird durch Rekombinationsereignisse bei dem Marker D11S928 bei Person IV-3 und IV-8 begrenzt (Abb.6.; Sasse-Klaassen et al., 2004).

Haplotypen-Analysen zweier anderer Familien mit autosomal-dominant vererbter LVNC (LVNC-101 und LVNC-104; Sasse-Klaassen et al., 2003) zeigten keine Kopplung an den hier detektierten Locus 11p15. Dies unterstreicht, dass die autosomal dominant vererbten Formen der LVNC genetisch heterogen sind.

2.2.2.3 Charakterisierung des kritischen genomischen Bereichs auf Chromosom 11p15 und Kandidatengenanalyse

In dem detektierten Locus für LVNC von 6.8 Mb Größe finden sich 51 bzw. 68 Gen-Annotierungen (nach Datenbanken: Ensembl human genome browser bzw. NCBI human genome assembly). Die Funktion der meisten Gene in diesem Abschnitt ist bekannt. Derzeit liegen für fast alle chromosomalen Bereiche zuverlässige Sequenzdaten vor. Somit können relativ große Bereiche von 6 Mb sehr genau auf krankheitsverursachende Mutationen untersucht werden. Weiterhin bieten die zur Verfügung stehenden Mutationsanalyseverfahren einen hohen Grad an Sensitivität und Spezifität, unbekannte Mutationen zu detektieren.

Für LVNC auf 11p15 kam insbesondere *MLP/CSRP3* als Kandidatengen in Frage. MLP gehört zu einer Gruppe von Genen, deren Proteinprodukten – sog. LIM-Domänen Proteine –wichtige regulatorische Funktionen bei der Genregulation, Zellwachstum und somatischer Differenzierung zugesprochen werden (Arber et al., 1997). Mutationen im MLP können zu DCM und HCM führen (Geier et al., 2003; Knöll et al., 2003).

Durch weitere Feinkartierung konnte das Krankheitsgenintervall auf eine genetische Größe von 4,9 cM, entsprechend einer physikalischen Größe von 3,2 Mb, eingengt

werden. Zum Zeitpunkt der Kopplungsanalyse beinhaltete der Locus 40 Gene. Der neue LVNC-Krankheitsgenlocus auf Chromosom 11p15 wurde charakterisiert und insgesamt 32 Gene auf eine Punktmutation in der kodierenden Sequenz untersucht. Zwei besonders interessante Kandidatengene (CSRP3 und PIK3C2A) wurden im Detail analysiert (Sequenzierung des Promotorbereichs, Southern Blot Analyse, Long-range PCR, Sequenzierung des gesamten genomischen Bereichs von CSRP3). Eine krankheitsverursachende Mutation oder größere genomische Abberation konnte nicht aufgedeckt werden. Die semi-quantitative Expressionsanalyse zeigte RT-PCR-Produkte im Herzmuskelgewebe bei 22 der 40 Gene des Krankheitsgenlocus. CSRP3 ist das einzige Gen des Krankheitsgenlocus, das nur im Herz- und Skelettmuskel und keinem weiteren Gewebetyp exprimiert wird und als Krankheitsgen durch die vorherigen Untersuchungen schon ausgeschlossen worden war. Schließlich sind noch bioinformatische Methoden zur Identifizierung von Krankheitsgenen zum Einsatz gekommen, die die durch in vitro-Daten erfolgte Priorisierung der Gene bestätigte, jedoch keinen neuen Anhalt für ein bestimmtes Krankheitsgen erbrachten.

Originalarbeit 2

**Novel gene locus for autosomal dominant left ventricular noncompaction maps
to chromosome 11p15**

**Sasse-Klaassen S, Probst S, Gerull B, Oechslin E, Nürnberg P, Heuser A, Jenni
R, Hennies HC, Thierfelder L**

Circulation 2004; 109:2720-2723

Seiten 27-30

2.2.3 Ein neuer Genlokus für dilatative Kardiomyopathie, diffuse myokardiale Fibrose und plötzlichem Herztod auf Chromosom 10q25

Über 20-35 % der Fälle von idiopathischer DCM sind familiär. Dabei wird eine inkomplette und altersabhängige Penetranz der Erkrankung beobachtet (Maron, 2006). Der hauptsächliche Vererbungsmodus ist autosomal dominant (90%), es werden aber auch X-chromosomale, autosomal rezessive und mitochondriale Vererbung beobachtet. Über 20 genetische Loci und Gene sind für DCM beschrieben worden (Ahmad et al. 2005).

Die DCM-Krankheitsgene können nach der biologischen Funktion der Proteine, für die sie kodieren, in verschiedene Gruppen eingeteilt werden:

- Zytoskelettale Proteine
 - Dystrophin (X-chromosomal)
 - δ -Sarcoglycan
 - Desmin
 - Metavinculin
- Sarcomere Proteine
 - β -Myosin heavy chain
 - Troponin T
 - α -Tropomyosin
 - α Cardiac actin
 - Titin
- Z -Banden Proteinen
 - MLP / Muscle LIM protein
 - ZASP/ LIM domain binding protein 3
- Andere oder unbekannte Funktionen
 - Lamin A/C
 - Phospholamban
 - Eyes absent 4
 - SCN5A
 - Taffazin (X-chromosomal)
 - Desmoplakin (autosomal-rezessiv)

Obwohl viele verschiedene Gendefekte identifiziert wurden, sind sie vermutlich insgesamt nur für einen kleinen Teil der Erkrankungsfälle verantwortlich. Die meisten Gene wurden nur in einzelnen Familien mit DCM beschrieben. Studien zur Häufigkeit aller verschiedenen Krankheitsgene in großen Patientenkollektiven sind noch nicht durchgeführt worden. Bisherige Untersuchungen legen jedoch nahe, dass die Mehrzahl der verantwortlichen DCM Krankheitsgene bisher noch nicht identifiziert wurde. Wir untersuchten zwei Familien, in denen wir eine Kopplung an alle bekannten Genorte ausschließen konnten und führten jeweils eine genomweite Kopplungsanalyse durch.

Es wurden 66 Familienmitglieder klinisch untersucht und echokardiographisch die Diagnose der DCM gestellt. Patienten, die älter als 20 Jahre waren und keine Auffälligkeiten im Oberflächen-EKG, in der Echokardiographie, keine Anamnese von Herzinsuffizienz oder betroffene Kinder hatten, wurden als unbetroffen eingestuft. Die genomweite Kopplungsanalyse wurde mit 445 STR-Markern durchgeführt (Abb.7).

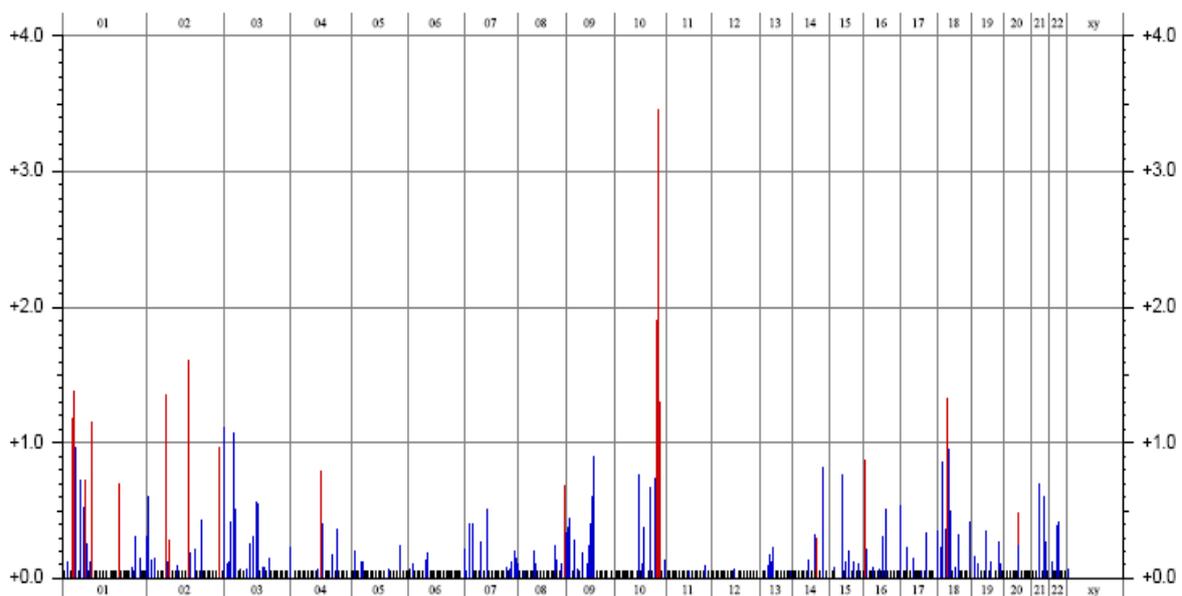


Abb. 7 Genomweite Zwei-Punkt-LOD-Wert-Analyse mit STR-Markern bei der Familie DCM-100. Blau=mindestens eine Rekombination; rot=keine Rekombination

Durch die genomweite Kopplungsanalyse wurde ein neuer Genlokus auf Chromosom 10q25.3-q26.13 identifiziert. Die Zwei-Punkt LOD Scores lagen unabhängig voneinander in jeder der beiden Familien über 3.0. Die Haplotypanalyse beider Familien ergab ein kritisches Krankheitsintervall von 14.0 cM zwischen den Markern D10S1237 und D10S1723. Dieses genetische Intervall entspricht einem

physikalischen Abstand von 9.5 Mb. Die Multipunkt-Analyse bestätigte dieses Intervall und zeigte einen maximalen LOD-Wert von 8.2. Dies entspricht einer Wahrscheinlichkeit von 100 Millionen:1, dass der Gendefekt für die DCM in dieser Familie in diesem Intervall liegt (Ellinor et al., 2006).

Auch in dieser Familie konnte durch weitere Feinkartierung das genetische Intervall weiter eingeeengt werden. Es resultierte ein Intervall von 6.2 Mb und 10.8 cM. In diesem Intervall befanden sich 44 Gene, von denen für 27 Gene die Funktion bekannt war. 15 Gene galten als wahrscheinlich nicht krankheitsverursachend, da sie anhand von Northern blots oder RT-PCR nicht kardial exprimiert waren (13 Gene) oder es sich um Pseudogene handelte (2 Gene). 29 Gene waren im Herzen exprimiert, wobei es sich bei 21 Genen um bekannte Gene, bei 8 Genen um vorhergesagte Gene handelte. Die besten Kandidatengene waren:

- *GRK5*: Phosphorylierung und Aktivierung von verschiedenen G-Protein-gekoppelten Rezeptoren
- *RGS10*: Aktivierung der GTPase-Aktivität von G-Proteinen
- *BAG3*: Inhibiert die Chaperon-Aktivität von HSP70
- *PLEKHA1*: bindet an Syntrophin, einem zytoskelettalen Protein (Abb.5)

Auf genomischer Ebene konnte in den 29 im Herzen exprimierten Genen keine Mutation nachgewiesen werden. Da von einem herztransplantierten Patienten der Familie DCM-100 Herzgewebe verfügbar war, konnten wir einige Gene auf cDNA-Ebene sequenzieren. Auch die Mutationsanalyse der Transkripte von *GRK5*, *RGS10*, *BAG3* und *PLEKHA1* ergab keine Mutation.

Originalarbeit 3

A novel locus for dilated cardiomyopathy, diffuse myocardial fibrosis and sudden death on chromosome 10q25-26

Ellinor PT, Sasse-Klaassen S, Probst S, Gerull B, Shin JT, Töppel A, Heuser A, Michely B, Yoerger DM, Song BS, Pilz B, Krings G, Coplin B, Lange PE, Dec GW, Hennies HC, Thierfelder L, MacRae CA

J Am Coll Cardiol 2006; 48:106-111

Seiten 34-39

2.3 Linksventrikuläre Noncompaction des Myokards (LVNC)

2.3.1 Klinisches Bild der LVNC

Die linksventrikuläre Noncompaction des Myokards (LVNC) wurde erstmals definiert durch Chin et al. (1990) und ist eine selten vorkommende, kongenitale Kardiomyopathie. In der WHO Klassifikation von 1996 wurde sie einer heterogenen Gruppe nicht-klassifizierter Kardiomyopathien zugeordnet (Richardson et al., 1996). In der neuesten Klassifikationen der American Heart Association (AHA) handelt es sich um eine eigenständige Kardiomyopathie (Maron et al., 2006). Nach der neuen Definition der Kardiomyopathien der European Society of Cardiology (ESC) bleibt die LVNC weiterhin unklassifiziert (Elliott et al., 2008).

Charakteristisch sind zahlreiche prominente Trabekel neben tiefen, intertrabekulären Recessus innerhalb hypertrophierter und gleichzeitig hypokinetischer Segmente des linken Ventrikels (Jenni et al. 1999; Oechslin et al., 2000). Definitionsgemäß gibt es die isolierte LVNC, die ohne eine weitere strukturelle Herzerkrankung auftritt (Chin et al., 1990). Die LVNC in Kombination mit angeborenen Herzfehlern wird als nichtisolierte LVNC bezeichnet (Ichida et al., 2001).



Abb. 8. Linker Ventrikel mit LVNC; prominente Trabekel (schwarzer Pfeil), intertrabekuläre Recessus (weißer Pfeil).

Als Ursache der LVNC wird ein Stillstand der Myokardentwicklung während der Embryogenese mit dem Resultat einer fehlenden Kompaktierung des initial locker angelegten, myokardialen Gewebes vermutet (Chin et al., 1990; Sedmera et al., 2000). Histologisch zeigen sich neben der typischen, oben beschriebenen Myokardstruktur auch Areale mit ischämischen Läsionen und interstitieller Fibrose (Jenni et al., 2001). Alle Trabekel und Recessus sind kontinuierlich mit Endokard ausgekleidet (Abb. 8). Jenni et al. schlugen 2001 für die isolierte LVNC vier Kriterien vor, um mittels echokardiographischer Diagnostik die Morphologie eindeutig zu definieren:

- a) Zweischichtige Struktur des Myokards; bestehend aus einer dünnen, kompakten, epikardial gelegenen und einer dicken, nicht-kompakten endokardial gelegenen mit ausgeprägtem trabekulärem Geflecht und tiefen endomyokardialen Spalten. Ein endsystolisch gemessenes Verhältnis zwischen nicht-kompakter und kompakter Schicht von >2 ist diagnostisch.
- b) Neben der charakteristischen Trabekularisierung lassen sich keine weiteren strukturellen kardialen Anomalien nachweisen.
- c) Die prädominante Lokalisation des nicht-kompaktierten Myokards befindet sich midventrikulär (lateral $>$ inferior) und apikal.
- d) Nachweis von Blutfluß in die tiefen intertrabekulären Recessus durch Farbdoppler-Echokardiographie (Abb.9).



Abb. 9. Echokardiographie von Patienten mit LVNC; Links: Apikaler Vierkammerblick; Farbdopplerbild zeigt tiefe Recessus, die mit Blut aus dem linksventrikulären Cavum gefüllt werden in Enddiastole. Rechts: Parasternale kurze Achse mit zweischichtigem Myokard in Enddiastole.

Die LVNC wird sowohl bei Kindern als auch bei Erwachsenen diagnostiziert. Insgesamt wird die Krankheit als selten angesehen. Für die Altersgruppe von 0 bis 10 Jahren wurde die jährliche Inzidenz unklassifizierter Kardiomyopathien mit 0,17:100.000 (ca. 1:600.000) bestimmt. Daraus konnte rechnerisch auf eine Inzidenz der LVNC von schätzungsweise 0,12:100.000 (ca. 1:800.000) (Nugent et al., 2003) geschlossen werden. In einem Kollektiv von konsekutiv durchgeführten Echokardiographien in einem tertiären Referenzzentrum war die Prävalenz von isolierter LVNC bei Erwachsenen 0.014% (Oechslin et al. (2000). In einem pädiatrischen Kollektiv konnte die Prävalenz von isolierter und nicht-isolierter LVNC bei konsekutiv durchgeführten Echokardiographien mit 1,26% bestimmt werden (Lilje et al., 2006). Klinisch imponiert bei Patienten mit LVNC eine Herzinsuffizienz variabler Ausprägung. Als Komplikationen treten frühes Herzversagen, ventrikuläre Arrhythmien und systemische Embolien auf (Oechslin et al., 2000). Die symptomatische Therapie besteht aus Herzinsuffizienztherapie, Antikoagulation und antiarrhythmischer Therapie. Bei schweren ventrikulären Arrhythmien ist die Implantation eines intrakardialen Defibrillators indiziert. Die Prognose hängt desweiteren wesentlich von der Progression der Herzinsuffizienz ab. Als Ultima ratio bleibt eine Herztransplantation die einzige Therapieoption.

2.3.2 Die LVNC als autosomal dominante Erkrankung

Chin et al beschrieben 1990 erstmals mehrere Fälle von isolierter LVNC bei Kindern und Jugendlichen, unter denen sich familiäre Fälle befanden. Ein familiäres Auftreten der Erkrankung wurde auch von Ritter M et al. (1997) bei Erwachsenen beobachtet. In einer Familie konnten Fälle von isolierter LVNC bei männlichen Säuglingen auf eine Punktmutation im X-chromosomal vererbten G4.5 Gen zurückgeführt werden (Xq28; OMIM, #300183; Bleyl et al., 1997). Das G4.5 Gen kodiert das Protein Tafazzin, eine Phospholipid-Acyltransferase, das Auswirkungen auf die Anordnung und Stabilität der Komplexe der Atmungskette in der Mitochondrienmembran hat (Brandner et al., 2005). Mutationen im G4.5 Gen verursachen auch das X-chromosomal vererbte Barth-Syndrom, gekennzeichnet durch Neutropenie, Kardiomyopathie, Muskelschwäche und Wachstumsstörung sowie andere Formen infantiler dilatativer Kardiomyopathien (Bione et al., 1996; D'Adamo et al., 1997). Die klinischen Manifestationen der Erkrankung sind bei Kindern und auch bei Erwachsenen ähnlich und bestehen in einer eingeschränkten linksventrikulären systolischen Funktion, systemischen Thrombembolien und ventrikuläre Arrhythmien. Molekulargenetische Untersuchungen von erwachsenen Patienten waren nicht durchgeführt worden.

Wir begannen 1999 eine Kohorte von erwachsenen Indexpatienten mit LVNC zusammenzustellen und diese Indexpatienten und deren verfügbare erstgradige Familienangehörigen klinisch und genetisch zu evaluieren. Wir testeten die Hypothese, dass die LVNC bei Erwachsenen eine genetische Grundlage hat. Wir wollten prüfen, welchem Vererbungsmodus die LVNC bei Erwachsenen folgt. Desweiteren wurde nach Mutationen im G4.5 Gen in dieser Patientenkohorte gesucht.

Es wurden 25 erwachsene Indexpatienten mit LVNC klinisch und genetisch evaluiert (s. Kapitel 3.2.2). Es konnten keine Mutationen im G4.5 Gen gefunden werden (Sasse-Klaassen et al., 2003). Mutationen im G4.5 Gen sind bei Patienten mit LVNC selten, was durch Studien anderer Gruppen bestätigt wurde (Chen et al., 2002; Kenton et al., 2004). Die durchgeführten Stammbaumanalysen führten zu mehreren Familien mit autosomal dominanter Vererbung der LVNC. Für eine X-chromosomale Vererbung lagen bei den erwachsenen Patienten keine Hinweise vor. Am größten Familienstammbaum ist eine genomweite Kopplungsanalyse durchgeführt worden

(Kapitel 3.2.2, Abb.6). Es gibt daher zwei genetisch unterschiedliche Formen der LVNC: 1. Die X-chromosomal gekoppelte LVNC, die sich früh im Säuglingsalter bei männlichen Individuen manifestiert und 2. Die autosomal dominante Form mit Beginn der Symptomatik im Erwachsenenalter.

Originalarbeit 4

**Isolated noncompaction of the left ventricular myocardium in the adult is an
autosomal dominant disorder in the majority of patients**

Sasse-Klaassen S, Gerull B, Oechslin E, Jenni R, Thierfelder L

Am J Med Genet A. 2003;119:162–167

Seiten 45-50

2.3.3 Kandidatengenscreening bei Indexpatienten mit isolierter LVNC

Nachdem wir einen autosomal-dominanten Vererbungsmodus für mehrere Familien mit LVNC beschreiben konnten (OMIM #604169, Sasse-Klaassen et al., 2003), suchten wir nach den krankheitsverursachenden Genen von autosomal dominanter LVNC.

Eine Aminosäuresubstitution in α -Dystrobrevin (*DTNA*) (18q12) ist bei einer Familie mit LVNC und variablen Formen von angeborenen Herzfehlern gefunden worden (Ichida et al, 2001). In einer Familie mit vererbter DCM und einer Mutation im Gen LaminA/C (*LMNA*) (1q21) zeigte ein Familienmitglied die charakteristische kardiale Morphologie einer LVNC (Hermida-Prieto et al. 2004). Desweiteren sind Mutationen im Gen LIM domain binding 3 (*LDB3*) (10q22), das für z-band alternatively spliced pdz motif-containing protein (*ZASP*) kodiert, bei Indexpatienten mit LVNC gefunden worden (Vatta et al., 2003). Mutationen in *LDB3* verursachen auch DCM. Die genannten 3 Gene kodieren jeweils für Strukturproteine des Zytoskeletts, der Kernlamina beziehungsweise der Z-Scheibe (Abb. 5).

Außer den beim Menschen gefundenen Krankheitsgenen gibt es verschiedene knock-out -Mausmodelle, die ein morphologisch typisches hypertrabekularisiertes Myokard zeigen und deshalb die ausgeschalteten Gene Kandidatengene für LVNC sind. Bei den ausgeschalteten Genen handelt es sich um Transkriptionsfaktoren oder regulatorische Proteine, die für die korrekte embryonale Entwicklung des Herzmuskels wichtig sind. Im murinen Tiermodell wiesen FK506 Binding Protein-12 (FKBP12) - defiziente Mäuse eine schwere dilatative Kardiomyopathie und Ventrikelseptumdefekte mit dem Bild einer Hypertrabekularisierung auf (Shou et al., 1998). FKBP12 moduliert die Kalziumfreisetzung aus Ryanodin-Rezeptoren im Herz- und Skelettmuskel. Erst kürzlich konnte eine Überexpression von bone morphogenetic protein 10 (*BMP10*) in den FKBP12-defizienten Herzen nachgewiesen werden (Chen et al., 2004). *BMP10* gehört zur Familie der TGF β -Transkriptionsfaktoren und ist gewebespezifisch nur im Herzen exprimiert. Während der embryonalen Entwicklung ist *BMP10* transient besonders in den myokardialen Trabekeln exprimiert. *BMP10* - defiziente Mäuse sind schon embryonal aufgrund einer gestörten Myokardentwicklung und -funktion nicht lebensfähig (Chen et al., 2004); die Ventrikelwand ist hypoplastisch. In einem weiteren Tiermodell wurde die

Bedeutung von *Nkx2-5/CSX* für den intrauterinen ventrikulären Entwicklungsprozess und die Myozytendifferenzierung untersucht. Es zeigte sich, dass ventrikelspezifisch *Nkx2-5* defiziente Mäuse eine progressive Kardiomyopathie mit vermehrten Trabekeln, nonkompaktem Myokard und kompletter atrioventrikulärer Überleitungsstörung aufwiesen (Pashmforoush et al., 2004). Pauli et al. hatten 1999 ein 7-jähriges Mädchen mit einem komplexen angeborenem Herzvitium und LVNC beschrieben, bei der eine distale Deletion des *CSX/Nkx2-5-Locus* (5q34 – 5q35.1) nachgewiesen werden konnte. Bei den *Nkx2-5* defizienten Mäusen lag wie bei den *FKBP12* defizienten Mäusen eine *BMP10* Überexpression vor. In vitro konnten Pashmforoush et al. (2004) wie auch Chen et al. (2004) direkt nachweisen, dass *BMP10* myokardiales Wachstum stimuliert.

Wir untersuchten die vier LVNC-Kandidatengene, *LDB3*, *LMNA*, *Nkx2.5* und *BMP10*, bei 63 Patienten mit isolierter LVNC. Die Patientenkohorte enthielt 43 Männer und 20 Frauen und das Durchschnittsalter der Patienten bei Diagnosestellung war 40 Jahre (min. 15 Jahre, max. 71 Jahre). α -Dystrobrevin (*DTNA*) und G4.5 sind nicht in das Mutationsscreening einbezogen worden. Patienten mit einer Mutation in *DTNA* haben strukturelle angeborene Herzfehler und die durch G4.5 verursachte LVNC ist X-chromosomal vererbt und tritt bereits im Kleinkindalter auf. Bei den von uns untersuchten Indexpatienten lag nur die isolierte Form der LVNC vor und es handelte sich um erwachsene Patienten. In den untersuchten Kandidatengenen sind 2 neue, bisher unbekannte Nukleotidsubstitutionen gefunden worden, die einen Aminosäureaustausch bewirken: 241A>G in *Nkx2.5* (Gln22Arg) und 1573G>A in *LDB3* (Val635Ile). Diese Substitutionen sind jeweils nur bei einem Indexpatienten gefunden worden. Die betroffenen Aminosäuren sind bis zum Zebrafisch konserviert. Um zu klären, ob es sich um einen single nucleotide polymorphism (SNP) handelt, wurde das entsprechende Exon in *LDB3* und *Nkx2.5* bei 230 gesunden Kontrollindividuen sequenziert. In keinem der 460 untersuchten Chromosomenabschnitte sind diese Veränderungen gefunden worden. Der Austausch Gln22Arg in *Nkx2.5* kosegregierte jedoch nicht mit der Erkrankung, so dass lediglich die Substitution Val635Ile in *LDB3* als krankheitsassoziierter Aminosäureaustausch gefunden werden konnte. Mutationen in bekannten Krankheits- und Kandidatengenen für LVNC sind demnach selten (<5%). Es mussten daher noch weitere, bisher unbekannte Gene für die Erkrankung verantwortlich sein.

2.3.4 Mutationen in Genen, die für sarkomere Proteine kodieren, lösen LVNC aus

Veränderungen in Genen, die für sarkomere Proteine kodieren, sind die Hauptursache für die genetisch bedingte HCM und DCM. Es ist bekannt, dass Mutationen in denselben sarkomeren Genen verschiedene Herzmuskelerkrankungen verursachen. Mogensen et al. hatten 1999 Mutationen im *ACTC* in einer Familie mit HCM gefunden, obwohl dieses Gen vorher nur im Zusammenhang mit DCM bekannt war. Danach wurde in weiteren Proteinen des Sarkomers, die als Krankheitsgene für HCM bekannt waren, wie *MYH7* und *TNNT2*, Mutationen in Patienten mit DCM gefunden (Kamisago et al. 2000). Mutationen in *TNNI3* sind auch bei Patienten mit RCM gefunden worden (Mogensen et al., 2003). Auf der anderen Seite erfüllen einige LVNC-Patienten neben den diagnostischen Merkmalen der LVNC auch die anderer Kardiomyopathien wie der DCM, HCM und restriktiver Kardiomyopathie (RCM) (Biagini et al., 2006). Dies gilt insbesondere für die linksventrikuläre Dilatation und Funktionseinschränkung der DCM. Unter diesen Voraussetzungen ist es möglich, dass Veränderungen in sarkomeren Proteinen auch zu LVNC führen können.

Wir untersuchten erstmals Gene sarkomerer Proteine auf Mutationen in einer Kohorte von 63 LVNC Patienten: *MYH7*, *ACTC*, *TNNT2*, *TNNI3*, *MYL2* und *MYL3*. Die Mutationsanalyse aller kodierenden Exons wurde mit der DHPLC (denaturing high pressure liquid chromatography)-Methode durchgeführt. Bei Indexpatienten mit abweichendem Chromatogramm wurde eine direkte Sequenzierung durchgeführt. Bei 11 der 63 Patienten (17%) fanden wir krankheitsassoziierte Veränderungen in Genen, die für sarkomere Proteinen kodieren: *MYH7*, *ACTC* und *TNNT2*. In den Genen *TNNI3*, *MYL2* und *MYL3* waren keine Mutationen vorhanden (Klaassen et al., 2008).

2.3.4.1 Mutationen in *MYH7*

Bis zu 25% der HCM- Patienten weisen eine Mutation in *MYH7* auf (Richard et al., 2003). Auch in dem hier untersuchten LVNC-Kollektiv ist dieses Gen bei einem großen Teil der Patienten (13%) krankheitsassoziiert. Es wurden 7 verschiedene Mutationen bei 8 Patienten gefunden, die zu Aminosäureaustauschen, einer Deletion und Spleißstellenveränderungen führen. Zu jeder Mutation ist die DNA von 180 gesunden Kontrollen untersucht worden und in keinem der 360 Chromosomen waren

diese Veränderungen vorhanden. Das Alignment von Myosinproteinen verschiedener Spezies zeigte eine starke Konservierung der mutierten Aminosäuren. Bei 4 der 8 Mutationen im *MYH7*-Gen standen zusätzlich zum Indexpatienten DNA und klinische Daten von weiteren Familienmitgliedern zur Verfügung. Damit konnte die Kosegregation der Mutationen 814G>A, 818+1G>A und 818+3G>C mit der Erkrankung in den Familien gezeigt werden. Die Spleißstellenmutation 818+1G>A war in 2 Familien (LVNC-101 und LVNC-108) zu finden. Durch eine Haplotypanalyse der erkrankten Familienmitglieder mit dem STR-Marker D14S990 wurde ein gemeinsamer genetischer Ursprung der Mutation ausgeschlossen. Die Kopplungsanalyse in der Familie LVNC-101 ergab einen LOD-Wert von 2,55 mit dem STR-Marker D14S990. 5 der 7 Mutationen waren im Exon 8 und 9 zu finden. Im korrespondierenden Protein befinden sich diese Veränderungen in der ATP-Bindungstasche des Myosin-Kopfes (Rayment et al., 1995). Aufgrund der Eigenschaften und Lage der Aminosäuren kann von einer verminderten ATP-Bindung und –Hydrolyse der veränderten Myosin-Proteine ausgegangen werden und damit von einer veränderten Krafterzeugung in den Kardiomyozyten (Grigorenko et al., 2007). Aufgrund der fehlenden Kristallstruktur für den Myosinschwanz sind keine verlässlichen Vorhersagen zur Funktion von zwei Mutationen in Exon 30 und 37 möglich. Zwei weiteren Mutationen, 818+1G>A und 818+3G>C liegen in der Donorspleißstelle des Intron 8. Es sind die ersten Spleißstellenmutationen in *MYH7* bei Patienten mit Herz- oder Skelettmuskelerkrankungen, die bisher gefunden wurden (Online Mendelian Inheritance in Man; OMIM). In den Lymphozyten des Patientenbluts sind verschiedene Spleißvarianten des *MYH7*-Transkripts nachgewiesen worden, wobei eines ein vorzeitiges Stopp-Kodon bewirkt. Ob es translatiert wird und welche Auswirkung das trunkierte Protein auf die Sarkomerstruktur hätte, konnte ohne Herzmuskelgewebe eines Patienten nicht untersucht werden.

2.3.4.2 Mutationen in *ACTC*

Die Analyse des *ACTC* ergab eine Nukleotidsubstitution in Exon 3 (478G>A) bei 2 der untersuchten Indexpatienten. Zu beiden Patienten waren DNA und klinische Daten der Eltern vorhanden (LVNC-110, LVNC-111). Die Sequenzierung und die Befunde zeigten, dass die von LVNC betroffenen Väter die Erkrankung an ihre Kinder vererbt hatten. Eine Haplotyp-Analyse mit einem intragenischen STR-Marker schloss einen gemeinsamen genetischen Ursprung der Mutation in beiden Familien

aus. Die Glu101Lys Missensemutation in *ACTC*, die bei 2 Indexpatienten gefunden wurde, war bereits als genetische Ursache der apikalen HCM bekannt (Arad et al., 2005). Von Monserrat et al. ist 2007 eine Familie mit vererbter apikaler HCM und Glu101Lys Substitution beschrieben worden, bei der einige Familienmitglieder eher die Kriterien einer LVNC erfüllen. Der Aminosäureaustausch Glu101Lys befindet sich in einem Bereich des Aktin-Moleküls, das sich gegenüber des Myosinkopfes befindet. Die fehlende negative Ladung des Glu101 verursacht eine Schwächung der Aktomyosin-Bindung. In einem Zellexpressionssystem zeigte sich der primäre Effekt des Glu101Lys in einer langsameren Bewegung und reduzierten durchschnittlichen Kraft. Diese Defizite auf molekularer Ebene scheinen ausreichend für eine pathologische Veränderung des Myokards (Bookwalter et al., 2006).

2.3.4.3 Mutation in *TNNT2*

Die Untersuchung der kodierenden Bereiche des *TNNT2* zeigte eine Missense-Mutation (Arg131Trp) in Exon 10 bei einer LVNC-Patientin. Es handelt sich um eine de novo-Mutation, weil die gesunden Eltern kein mutiertes Allel aufweisen und die Genotypisierung mit dem STR-Marker D1S2703 die Verwandtschaft zu den Eltern bestätigte. Das betroffene Arg131 in der Troponin-Schwanz-Domäne ist evolutionär hochkonserviert. Der zugrunde liegende 450C>T-Austausch wurde in keinem der 360 untersuchten Kontrollchromosomen gefunden. Troponin T ist die Tropomyosin- und Aktin-bindende Untereinheit des Troponin-Komplexes im dünnen Muskelfilament. Dieser Komplex reguliert die Muskelkontraktion in Abhängigkeit von der intrazellulären Kalziumionen-Konzentration. Die Arg131Trp - Missensemutation befindet sich in der Schwanz-Domäne, die für die kritische Interaktion des Troponin-Komplexes mit Tropomyosin verantwortlich ist (Palm et al., 2001). Veränderungen in dieser Domäne haben Auswirkungen auf Faltung und Stabilität von *TNNT2*. Die Arg131Trp-Mutation ist bereits in einer Familie mit DCM gefunden worden (Mogensen et al., 2004). Der Arg131Trp -Austausch im *TNNT2* kann somit zu DCM oder LVNC führen.

Originalarbeit 5

Mutations in sarcomere protein genes in left ventricular noncompaction

**Klaassen S, Probst S, Oechslin E, Gerull B, Krings G, Schuler P, Greutmann M,
Hürlimann D, Yegitbasi M, Pons L, Gramlich M, Drenckhahn JD, Heuser A,
Berger F, Jenni R, Thierfelder L**

Circulation 2008; 117:2893-901

Seiten 56-64

3 Diskussion

3.1 Myokardiales Remodeling der unterschiedlichen Kardiomyopathien

In den letzten Jahren wurde eine Vielzahl von Gendefekten identifiziert, die mit Kardiomyopathien assoziiert sind. Eine zentrale Rolle für die Ätiologie der Kardiomyopathien spielen die sarkomeren Proteine. Molekulare Defekte der sarkomeren Proteine führen durch unterschiedliches Remodelling des Myokards zu verschiedenen Kardiomyopathien (Klaassen et al., 2008). Aminosäureaustausche in demselben sarkomeren Protein können unterschiedliche Kardiomyopathien hervorrufen. In Bezug auf Mutationen in *MYH7* gibt es unterschiedliche Interpretationen. Da Mutationen in unterschiedlichen Domänen von *MYH7* HCM hervorrufen können, kann ein gemeinsamer Pathway vorliegen, durch den unterschiedliche Mutationen zur Manifestation der Kardiomyopathie führen (Blair et al., 2002). Mogensen et al. äußern hingegen, dass ein Zusammenspiel aus sarkomeren Mutationen, 'modifizierenden Genen' und nicht genetischen Faktoren der Umwelt (z.B. höhere Anfälligkeit für Viren und Toxine) für die heterogene Erscheinung der Herzmuskelerkrankungen verantwortlich sein kann (Mogensen et al., 2004). Es können wiederum identische Mutationen zu unterschiedlichen Kardiomyopathien führen. Ein Beispiel ist der Arg243His-Austausch in *MYH7*, der einerseits bei apikaler HCM und andererseits in der Familie LVNC-107 in unseren Arbeiten gefunden wurde. Von den von uns untersuchten Patienten erfüllte die LVNC-Indexpatientin mit der Arg131Trp-Substitution in *TNNT2* im Hinblick auf die LV-Dilatation auch Kriterien der DCM. Damit überlappt der Phänotyp dieser Patientin teilweise mit der DCM-Erkrankung eines bereits publizierten Falles mit derselben Arg131Trp-Substitution. Funktionelle in vitro-Analysen zu Ca²⁺-Bindung und ATPase-Aktivität bei ausgewählten HCM- und DCM Mutationen zeigen, dass die Mutation in *TNNT2* (Arg131Trp) außer einer direkten verringerten Ca²⁺-Bindung auch sekundär eine erniedrigte ATPase-Aktivität zur Folge hat (Robinson et al., 2007). Die LVNC-Mutationen in *MYH7* haben ebenfalls Auswirkungen auf ATP-Bindung und -Hydrolyse. Diese Effekte deuten auf eine gemeinsame funktionelle Störung durch die LVNC-Mutationen in *TNNT2* und *MYH7* hin. Der molekulare Mechanismus, der zu 3 unterschiedlichen Herzmuskelerkrankungen bei gleichen oder ähnlichen genetischen Voraussetzungen führt, ist noch ungeklärt (Abb. 10). Zur

Untersuchung der pathologischen Mechanismen können Mausmodelle mit den knock-ins der hier beschriebenen Mutationen dienen.

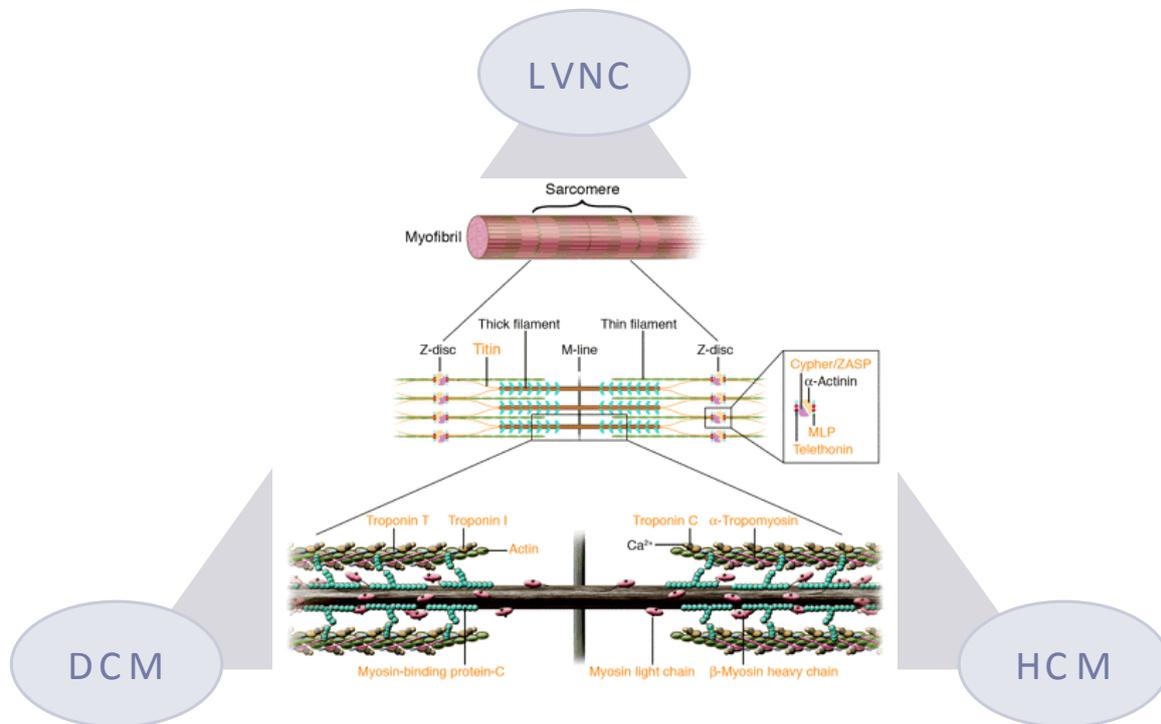


Abb. 10. LVNC, HCM und DCM. LVNC gehört zum diversen Spektrum der Kardiomyopathien, die durch Defekte in Genen, die für sarkomere Proteine kodieren, hervorgerufen werden. Unterschiedliche Phänotypen bei Kardiomyopathien sind auf eine gemeinsame molekulare Ätiologie zurückzuführen (verändert nach Morita et al., 2005).

3.2 LVNC als Defekt der Herzentwicklung

Aufgrund unserer Ergebnisse bleibt es noch ungeklärt, wie Mutationen in Genen für sarkomere Proteine Einfluß auf die kardiale Morphogenese nehmen. Über die molekulare Regulation des ventrikulären Kompaktierungsprozesses ist wenig bekannt. Die Mechanismen, die zu verschiedenen Kardiomyopathien führen, könnten schon während der Herzentwicklung einsetzen. Schon während der intrauterinen Entwicklung ist eine gewebe- und zeitspezifische Expression von Isoformen kontraktiler Proteine notwendig (Sasse et al., 1993; Marston et al., 2003). Der ontogenetische Übergang der Isoforme der sarkomeren Proteine dient der Anpassung des Embryos und Fetus an die veränderten hämodynamischen Verhältnisse nach der Geburt. Dies spricht für die Bedeutung der sarkomeren Proteine für Morphologie und Funktion im sich entwickelnden Herzen.

Untersuchungen zu Trabekelentstehung und Herzmuskelzellmorphologie könnten Hinweise auf die molekularen Zusammenhänge der Entstehung einer Kardiomyopathie sein. Im Zebrafisch ändert sich während der Herzkammerentwicklung die Zellmorphologie. Sogar kleinste Änderungen der Kontraktilität durch Mutationen in sarkomeren Proteinen können zu anomaler Zellmorphologie führen, die Auswirkungen auf die Kammermorphologie haben (Auman et al., 2007). Während der frühen myokardialen Entwicklung teilt sich die Herzwand in eine äußere kompakte Zone mit starker Proliferation und in eine innere, trabekularisierte Zone mit erhöhter Differenzierung. Das richtige Gleichgewicht zwischen Proliferation und Differenzierung der Kardiomyozyten scheint entscheidend für die Ventrikelentwicklung zu sein. Bei einer Notch1-Mausmutante ist die Umwandlung des einfachen myokardialen Epithels in kompaktes und trabekularisiertes Myokard und die Aufrechterhaltung der Proliferation während der Umwandlung gestört. Der Trabekulationsdefekt dieser Notch1-Mausmutante ähnelt dem Phänotyp von LVNC-Patienten (Grego-Bessa et al., 2007). Zu Downstream-Effektoren von Notch1 gehören auch *BMP10* und *Nkx2.5*. Die bisherigen Erkenntnisse aus Tiermodellen reichen jedoch nicht aus, um zu klären, wie Mutationen in sarkomeren Proteinen in die myokardiale Entwicklung eingreifen und zu LVNC führen können.

3.3 Genetische Kartierung

Die Gründe für das Nichtauffinden des ursächlichen Krankheitsgens für die Familien LVNC-105 und DCM-100 können vielfältig sein und in einer falsch-positiven Kopplung liegen oder dem Vorliegen einer Mutation, die mittels einer PCR-basierten Technologie nicht zu identifizieren ist (Sasse-Klaassen et al., 2004; Ellinor et al., 2006). Die Karyotypanalyse und die Array-CGH für die Detektion von größeren strukturellen chromosomalen Anomalien sind mit unauffälligem Ergebnis durchgeführt worden. Es könnte sich auch um eine Mutation, welche in nicht systematisch analysierten Intronsequenzen liegt, handeln. Das krankheitsverursachende Gen konnte demnach nicht gefunden werden, obwohl alle derzeit zur Verfügung stehenden Methoden eingesetzt wurden. Unter der Annahme dass das Krankheitsgenintervall korrekt ist, könnte das gesamte Intervall genomisch charakterisiert werden, was nur mit neuen Resequenzierungstechniken möglich ist (Gresham et al., 2008).

3.4 Klinische Bedeutung

Nach der Beschreibung von mehreren Familien mit autosomal dominanter LVNC (Sasse-Klaassen et al., 2003) wurde ein familiäres Auftreten der Erkrankung relativ häufig beobachtet. Xing et al. berichten von einem familiärem Auftreten bei etwa 25 % von 79 untersuchten LVNC-Patienten (Xing et al., 2006). Bisher sind wenige Patienten systematisch prospektiv untersucht worden und somit eine Aussage zur Häufigkeit der LVNC schwierig. Vor Beginn unserer Untersuchungen gab es keine häufigen Krankheitsgene für LVNC, sondern nur sehr wenige Fälle mit bekannter genetischer Ursache. Vorangegangene Mutationsscreenings waren an Patienten mit infantiler LVNC durchgeführt worden (Chen et al., 2002; Kenton et al. 2006). Die durchgeführte Analyse verschiedener Kandidatengene in einem großen Patientenkollektiv mit adulter LVNC offenbarte neue Krankheitsgene mit Mutationen bei einem großen Anteil der Indexpatienten. Mutationen in Genen sarkomerer Proteine sind in 17 % der adulten LVNC-Patienten für die Erkrankung verantwortlich (Klaassen et al., 2008). Die Kenntnis der krankheitsassoziierten Mutation hat Auswirkungen auf die genetische Beratung und kann im Einzelfall die Therapie der Erkrankung beeinflussen.

Die Ergebnisse zeigen, dass Veränderungen in sarkomeren Proteinen nicht nur zur HCM und DCM führen, sondern auch LVNC zur Folge haben. Es wird andererseits auch zunehmend klar, dass die gegenwärtigen Klassifikationen der erheblichen Überlappung zwischen den klassischen Kardiomyopathie-Syndromen nicht gerecht wird. Diese Diskordanz zwischen der Ätiologie und dem klinischen Syndrom ist eine der wichtigsten Ergebnisse unserer Studien.

3.5 Ausblick

Die ersten klinischen Studien zu LVNC suggerierten, dass LVNC häufig mit frühem Herzversagen, ventrikulären Arrhythmien und systemischen Embolien assoziiert ist (Oechslin et al., 2000). Neuere Studien beschreiben eine weitaus geringere Inzidenz von Komplikationen (Murphy et al., 2005). Dies ist wahrscheinlich auf den Einschluß von präsymptomatischen Patienten und von Patienten mit geringerer Ausprägung der Erkrankung zurückzuführen (Kohli et al., 2008). Langzeitstudien zum klinischen Verlauf der LVNC bei individuellen Patienten und deren Familien sind erforderlich, um den natürlichen klinischen Verlauf der Erkrankung zu zeigen. Die

charakteristische Morphologie der Erkrankung sowie deren kongenitales Auftreten unterscheidet die LVNC von der HCM und DCM. Es bleibt Aktualisierungen der beiden gegenwärtigen Klassifikationen der Kardiomyopathien überlassen, ob die LVNC im Sinne der Klassifikation der AHA tatsächlich eine eigenständige Kardiomyopathie ist und dies auch von der Klassifikation der European Society of Cardiology übernommen wird.

Die Mehrzahl der krankheitsverursachenden Mutationen in Genen für Kardiomyopathien ist weiterhin unbekannt, insbesondere für DCM und LVNC. Außerdem gilt es modifizierende Gene und extrinsische Faktoren zu erfassen, die die Expression des Phänotyps modulieren. Die genetischen Ursachen von Kardiomyopathien zu finden, ist aus verschiedenen Gründen weiterhin eine wichtige Aufgabe:

- a) Es handelt sich um Erkrankungen mit einer hohen Morbidität und Mortalität
- b) Die anatomischen und hämodynamischen Veränderungen, die mit Kardiomyopathien verbunden sind, werden auch bei erworbenen Herzerkrankungen und Herzinsuffizienz beobachtet. Ein besseres Verständnis der Pathogenese dieser Erkrankungen wird auch das Verständnis komplexer genetischer Herzerkrankungen verbessern.
- c) Anhand genetisch bedingter Kardiomyopathien können Mechanismen untersucht werden, die zeigen wie sich Kardiomyozyten an veränderte Erregungsbildung, Kraftentwicklung und-übertragung anpassen.

4 Zusammenfassung

Kraftentwicklung und deren Weiterleitung an die extrazelluläre Matrix sind die wesentlichen Aufgaben der Herzmuskelzelle. Ein Defizit in einem der Bestandteile dieses Prozesses führt zu kardialem Remodeling und zur Herzinsuffizienz. Wir konnten erstmals das normale Muster der Genexpression der Isoforme von Troponin I im menschlichen Myokard während der fetalen und postnatalen Entwicklung bestimmen. Veränderungen in der Troponin I-Genexpression trugen nicht zur verminderten myokardialen Kontraktilität bei herzinsuffizienten Patienten, unter anderem bei Patienten mit Kardiomyopathien, bei. Damit konnte gezeigt werden, dass die Reexpression fetaler Isoforme sarkomerer Proteine bei der Entwicklung der Herzinsuffizienz kein generell gültiger Mechanismus ist.

Zur Ermittlung der genetischen Ursache von Kardiomyopathien wurden genomweite Kopplungsanalysen in Familien mit einem großen Stammbaum über mehrere Generationen durchgeführt. Es wurde ein neuer Genlocus auf Chromosom 10q25-q26 für dilatative Kardiomyopathie (DCM) identifiziert.

Wir untersuchten die molekulargenetischen Ursachen der linksventrikulären Noncompaction des Myokards (LVNC), einer seltenen primären Kardiomyopathie, die auf eine embryonale Entwicklungsstörung des Myokards zurückzuführen ist. Wir konnten zeigen, dass es eine autosomal dominante Form der LVNC mit Beginn der Symptomatik der Herzinsuffizienz im Erwachsenenalter gibt. In unseren Arbeiten wurde außerdem die genetische Ursache der LVNC in der Familie LVNC-105 mit autosomal dominanter Vererbung untersucht und ein neuer Genlocus auf Chromosom 11p15 gefunden.

Weiterhin wurden in einem großen Kollektiv von erwachsenen LVNC-Indexpatienten Kandidatengenanalysen durchgeführt. Die hypertrophe (HCM) und die dilatative Kardiomyopathie (DCM) können durch Mutationen in verschiedenen Genen, die für sarkomere Proteine kodieren, ausgelöst werden. Die LVNC weist in einigen Fällen phänotypische Überlappungen mit der HCM und DCM auf. Erstmals wurden 6 Gene, die für sarkomere Proteine kodieren und als Krankheitsgene für HCM und DCM bekannt sind, untersucht. Es wurden Mutationen in einem großen Anteil der LVNC-Indexpatienten (17%) in β -Myosin Heavy Chain (*MYH7*), kardialem α -Actin (*ACTC*)

und kardialen Troponin T (*TNNT2*) identifiziert. *MYH7* war mit einem Anteil von 13% das häufigste Krankheitsgen und die Mutationen in *MYH7* lagen vorwiegend in der ATP-Bindungsstelle, die für die Kraftentwicklung des Kardiomyozyten eine wesentliche Rolle spielt. Die LVNC gehört damit zum diversen Spektrum der Kardiomyopathien, die durch Defekte in Genen, die für sarkomere Proteine kodieren, hervorgerufen werden. Unsere Ergebnisse unterstützen die Hypothese, dass unterschiedliche Phänotypen bei Kardiomyopathien auf eine gemeinsame molekulare Ätiologie zurückzuführen sind. Die sarkomeren Proteine sind nicht nur für die normale Funktion des Herzens von wesentlicher Bedeutung, sondern scheinen auch eine wichtige Rolle in der myokardialen Morphogenese während der embryonalen Entwicklung zu spielen.

5 Literaturverzeichnis

Ahmad F, Seidman JG, Seidman CE. The genetic basis for cardiac remodeling. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2005;6:185-216

Arad M, Penas-Lado M, Monserrat L, Maron BJ, Sherrid M, Ho CY, Barr S, Karim A, Olson TM, Kamisago M, Seidman JG, Seidman CE. Gene mutations in apical hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation*. 2005;112:2805–2811.

Arber S, Hunter JJ, Ross Jr.J, et al. MLP-deficient mice exhibit a disruption of cardiac cytoarchitectural organization, dilated cardiomyopathy, and heart failure. *Cell*. 1997; 88:393-403.

Auman HJ. ; Coleman H; Riley HE. ; Olale F; Tsai HJ; Yelon D. Functional Modulation of Cardiac Form through Regionally Confined Cell Shape Changes. *PLoS Biol* 2007;5:e53

Biagini E, Ragni L, Ferlito M, Pasquale F, Lofiego C, Leone O, Rocchi G, Perugini E, Zagnoni S, Branzi A, Picchio FM, Rapezzi C. Different types of cardiomyopathy associated with isolated ventricular noncompaction. *Am J Cardiol*. 2006;98:821–824.

Blair E, Redwood C, de Jesus Oliveira M, Moolman-Smook JC, Brink P, Corfield VA, Ostman-Smith I, Watkins H. Mutations of the light meromyosin domain of the beta-myosin heavy chain rod in hypertrophic cardiomyopathy. *Circ Res*. 2002;90:263–269.

Boheler KR, Carrier L, de la Bastie D, Allen PD, Komajda M, Mercadier JJ, Schwartz K (1992) *J Clin Invest* 88:323-330

Bione S, D'Adamo P, Maestrini E, et al. A novel X-linked gene, G4.5 is responsible for Barth syndrome. *Nat Genet*. 1996; 12:385-389.

Bookwalter CS, Trybus KM. Functional consequences of a mutation in an expressed human alpha-cardiac actin at a site implicated in familial hypertrophic cardiomyopathy. *J Biol Chem*. 2006;281:16777–16784.

Bleyl SB, Mumford BR, Thompson V, et al. Neonatal, lethal noncompaction of the left ventricular myocardium is allelic with Barth Syndrome. *Am J Hum Genet*. 1997; 61:868-872.

Brandner K; Mick DU. ; Frazier AE. ; Taylor RD; Meisinger C ; Rehling P. Taz1, an outer mitochondrial membrane protein, affects stability and assembly of inner membrane protein complexes: implications for Barth Syndrome. *Mol Biol Cell* 2005;16:5202–14

Chen R, Tsuji T, Ichida F, Bowles KR, Yu X, Watanabe S, Hirono K, Tsubata S; Hamamichi Y, Ohta J, Imai Y, Bowles NE, Miyawaki T, Towbin JA, Noncompaction study collaborators. Mutation analysis of the G4.5 gene in patients with isolated left ventricular noncompaction. *Mol Genet Metab.* 2002;77:319–325.

Chen H, Shi S, Acosta L, et al. *BMP10* is essential for maintaining cardiac growth during murine cardiogenesis. *Development.* 2004; 131:2219-2231

Chin TK, Perloff JK, Williams RG, et al. Isolated noncompaction of left ventricular myocardium: a study of eight cases. *Circulation.* 1990; 82:507-513.

D'Adamo P, Fassone L, Gedeon A, et al. The X-linked gene G4.5 is responsible for different infantile dilated cardiomyopathies. *Am J Hum Genet.* 1997; 61:862-867.

Ellinor PT, Sasse-Klaassen S, Probst S, Gerull B, Shin JT, Töppel A, Heuser A, Michely B, Yoerger DM, Song BS, Pilz B, Krings G, Coplin B, Lange PE, Dec GW, Hennies HC, Thierfelder L, MacRae CA. A novel locus for dilated cardiomyopathy, diffuse myocardial fibrosis and sudden death on chromosome 10q25-26. *J Am Coll Cardiol* 2006;48:106-111.

Elliott P, Andersson B, Arbustini E, Bilinska Z, Cecchi F, Charron P, Duborg O, Kühl U, Maisch B, McKenna WJ, Monserrat L, Pankuweit S, Rapezzi C, Seferovic P, Tavazzi L, Keren A. Classification of the cardiomyopathies: a position statement from the european society of cardiology working group on myocardial and pericardial diseases. *Eur Heart J.* 2008;29:270-276

Geier C, Perrot A, Özcelik C, et al. Mutations in the human muscle LIM protein gene in families with hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation.* 2003; 107:1390-1395.

Grego-Bessa, J; Luna-Zurita L, Monte, G del ; Bolós Vi; Melgar P; Arandilla Alejandro ; Garratt AN. ;Zang H; Mukoyama, YS ; Chen H; Shou W; Ballestar E Esteller M; Rojas A; Pérez-Pomares JM. ; Pompa, José L. I. Notch signaling is essential for ventricular chamber development. *Dev Cell* 2007;12:415–29

Gresham D, Dunham MJ, Botstein D. Comparing whole genomes using DNA microarrays. *Nat Rev Genet.* 2008;9:291-302

Grigorenko BL, Rogov AV, Topol IA, Burt SK, Martinez, HugoM, Nemukhin AV. Mechanism of the myosin catalyzed hydrolysis of ATP as rationalized by molecular modeling. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104:7057–7061.

Hermida-Prieto M; Monserrat L; Castro-Beiras A; Laredo R; Soler R; Peteiro J; Rodríguez E; Bouzas B ; Alvarez N ; Muñiz J; Crespo-Leiro M. Familial dilated cardiomyopathy and isolated left ventricular noncompaction associated with lamin A/C gene mutations. *Am J Cardiol.* 2004; 94:.50–54

Ichida F, Tsubata S, Bowles KR, Haneda N, Uese K, Miyawaki T, Dreyer WJ, Messina J, Li H, Bowles NE, Towbin JA. Novel gene mutations in patients with left ventricular noncompaction or Barth syndrome. *Circulation.* 2001;103:1256–1263.

Jenni R, Rojas J, Oechslin E. Isolated noncompaction of the myocardium. *N Engl J Med.* 1999;340:966–967.

Izumo S, Nadal-Ginard B, Mahdavi V (1988) *Proc Natl Acad Sci USA* 85:339-343

Jenni R, Oechslin E, Schneider J, Attenhofer Jost C, Kaufman PA. Echocardiographic and pathoanatomical characteristics of isolated left ventricular non-compaction: a step towards classification as a distinct cardiomyopathy. *Heart* 2001;86:666-671.

Kamisago M, Sharma SD, DePalma SR, Solomon S, Sharma P, McDonough B, Smoot L, Mullen MP, Woolf PK, Wigle ED, Seidman JG, Seidman CE. Mutations in sarcomere protein genes as a cause of dilated cardiomyopathy. *N Engl J Med.* 2000;343:1688–1696.

Kenton AB, Sanchez X, Coveler KJ, Makar KA, Jimenez S, Ichida F, Murphy RT, Elliott PM, McKenna W, Bowles NE, Towbin JA, Bowles KR. Isolated left ventricular noncompaction is rarely caused by mutations in G4.5, alpha-dystrobrevin and FKBinding Protein-12. *Mol Genet Metab.* 2004;82:162–166.

Knöll R, Hoshijima M, Hoffman HM, et al. The cardiac mechanical stretch sensor machinery involves a Z disc complex that is defective in a subset of human dilated cardiomyopathy. *Cell.* 2003; 111:943-955.

Kohli SK, Pantazis AA, Shah JS, Adeyemi B, Jackson G, McKenna WJ, Sharma S, Elliott PM. Diagnosis of left ventricular non-compaction in patients with left ventricular systolic dysfunction: time for a reappraisal of diagnostic criteria? *Eur Heart J* 2008;29:89-95

Klaassen S, Probst S, Oechslin E, Gerull B, Krings G, Schuler P, Greutmann M, Hürlimann D, Yegitbasi M, Pons L, Gramlich M, Drenckhahn JD, Heuser A, Berger F, Jenni R, Thierfelder L. Mutations in sarcomere protein genes in left ventricular noncompaction. *Circulation* 2008;117:2893-901

Lilje C, Razak V, Joyce JJ, Rau T, Finckh BF, Weiss F, Habermann CR, Rice JC, Weil J. Complications of non-compaction of the left ventricular myocardium in a paediatric population: a prospective study. *Eur Heart J* 2006;27:1855-1860

Maron BJ, Towbin JA, Thiene G, Antzelevitch C, Corrado D, Arnett D, Moss AJ, Seidman CE, Young JB; Contemporary definitions and classification of the cardiomyopathies: an American Heart Association Scientific Statement from the Council on Clinical Cardiology, Heart Failure and Transplantation Committee; Quality of Care and Outcomes Research and Functional Genomics and Translational Biology Interdisciplinary Working Groups; and Council on Epidemiology and Prevention. *Circulation*. 2006;113:1807–1816.

Marston SB, Redwood CS. Modulation of thin filament activation by breakdown or isoform switching of thin filament proteins: physiological and pathological implications. *Circ Res*. 2003; 93:1170-1178

Mogensen J, Klausen IC, Pedersen AK, Egeblad H, Bross P, Kruse TA, Gregersen N, Hansen PS, Baandrup U, Borglum AD. Alpha-cardiac actin is a novel disease gene in familial hypertrophic cardiomyopathy. *J Clin Invest*. 1999;103:R39–43.

Mogensen J ; Kubo T ; Duque M ; Uribe W; Shaw A ; Murphy R ; Gimeno JR. ; Elliott P ; McKenna WJ. Idiopathic restrictive cardiomyopathy is part of the clinical expression of cardiac troponin I mutations. *J Clin Invest*.2003; 111: 209–16

Mogensen J; Murphy RT.; Shaw T; Bahl A; Redwood C ;Watkins H; Burke M; Elliott PM. ; McKenna WJ. Severe disease expression of cardiac troponin C and T mutations in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol*. 2004;44:2033–40

Morano I (1999) Tuning the human heart molecular motors by myosin light chains. *J Mol Med* 77:544-555

Montserrat L, Hermida-Prieto M, Fernandez X, Rodriguez I, Dumont C, Cazañ L, Cuesta MG, Gonzalez-Juanatey C, Jesús Peteiro J, Alvarez N, Penas-Lado M, Castro-Beiras A. Mutation in the alpha-cardiac actin gene associated with apical hypertrophic cardiomyopathy, left ventricular non-compaction, and septal defects. *Eur Heart J*. 2007;28:1953-1961.

Morita H, Seidman JG, Seidman CE. Genetic causes of human heart failure. *J Clin Invest* 2005;115:518-526

Murphy RT, Thaman R, Blanes JG, Ward D, Sevdalis E, Papra E, Kiotsekolglou A, Tome MT, Pellerin D, McKenna WJ, Elliott PM. Natural history and familial characteristics of isolated left ventricular non-compaction. *Eur Heart J*. 2005;26:187–192.

Nugent AW, Daubeney PE, Chondros P, Carlin JB, Cheung M, Wilkinson LC, Davis AM, Kahler SG, Chow CW, Wilkinson JL, Weintraub RG; National Australian Childhood Cardiomyopathy Study. The epidemiology of childhood cardiomyopathy in Australia. *N Engl J Med*. 2003;348:1639-46.

Oechslin EN, Attenhofer Jost C, Rojas JR, Kaufmann PA, Jenni R. Longterm follow-up of 34 adults with isolated left ventricular noncompaction: a distinct cardiomyopathy with poor prognosis. *J Am Coll Cardiol*. 2000;36:493–500.

Oefner, PJ. ; Underhill, PA.: Comparative DNA sequencing by denaturing high-performance liquid chromatography (DHPLC). *Am J Hum Genet* 1995;57:A266

Palm, T ; Graboski, S ; Hitchcock-DeGregori, SE ; Greenfield, NJ. Disease-causing mutations in cardiac troponin T: identification of a critical tropomyosin-binding region. *Biophys J*. 2001; 81: 2827–37

Pashmforoush M, Lu JT, Chen H, et al. Nkx2-5 Pathways and congenital heart disease : loss of ventricular myocyte lineage specification leads to progressive cardiomyopathy and complete heart block. *Cell*. 2004; 117:373-386.

Pauli RM, Schreiber-Wixted S, Cripe L, et al. Ventricular noncompaction and distal chromosome 5q deletion. *Am. J. Med. Genet*. 1999; 85:419-423

Rayment I, Holden HM, Sellers JR, Fananapazir L, Epstein ND. Structural interpretation of the mutations in the beta-cardiac myosin that have been implicated in familial hypertrophic cardiomyopathy. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1995;92:3864–3868.

Richard P, Charron P, Carrier L, Ledeuil C, Cheav T, Pichereau C, Abdelaziz Benaiche A, Isnard R, Dubourg O, Burban M, Gueffet JP, Millaire A, Desnos M, Schwartz K, Hainque B, Komajda M, EUROGENE Heart Failure Project. Hypertrophic cardiomyopathy: distribution of disease genes, spectrum of mutations, and implications for a molecular diagnosis strategy. *Circulation*. 2003;107:2227–2232.

Richardson P, McKenna W ; Bristow M ; Maisch B ; Mautner B ; O’Connell J ; Olsen E; Thiene G ; Goodwin J ; Gyarfás I ; Martin I ; Nordet P: Report of the 1995 World Health Organization/International Society and Federation of Cardiology Task Force on the Definition and Classification of cardiomyopathies. *Circulation* 1996; 93:841–2

Ritter, M ; Oechslin, E ; Sütsch, G ; Attenhofer, C ; Schneider, J ; Jenni, R: Isolated noncompaction of the myocardium in adults. *Mayo ClinProc* 1997; 72:26–31

Robinson P ; Griffiths PJ. ; Watkins H; Redwood CS.: Dilated and Hypertrophic Cardiomyopathy Mutations in Troponin and alpha-Tropomyosin Have Opposing Effects on the Calcium Affinity of Cardiac Thin Filaments. *Circ Res*. 2007; 101:1266-73.

Sasse S, Brand NJ, Kyprianou P, Dhoot GK, Wade R, Arai M, Periasamy M, Yacoub MH, Barton PJR. Troponin I gene expression during human cardiac development and in end-stage heart failure. *Circ Res* 1993;72:932-938

Sasse-Klaassen S, Gerull B, Oechslin E, Jenni R, Thierfelder L. Isolated noncompaction of the left ventricular myocardium in the adult is an autosomal dominant disorder in the majority of patients. *Am J Med Genet A*. 2003;119:162–167

Sasse-Klaassen S, Probst S, Gerull B, Oechslin E, Nürnberg P, Heuser A, Jenni R, Hennies HC, Thierfelder L. Novel gene locus for autosomal dominant left ventricular noncompaction maps to chromosome 11p15. *Circulation* 2004;109:2720-2723

Schönberger J, Wang L, Shin JT, Jordan T, Kim SD, Depreux FFS, Zhu H, Zon, L, Pizard A, Kim JB, Macrae CA, Mungall A, Seidman JG, Seidman CE. Mutation in the transcriptional coactivator EYA4 causes dilated cardiomyopathy and sensorineural hearing loss. *Nat Genet* 2005;37:418-422

Sedmera D; Pexieder T ; Vuillemin M ; Thompson RP ; Anderson RH: Developmental patterning of the myocardium. *Anat Rec.* 2000; 258:319–37

Thierfelder L, Watkins H, MacRae C, Lamas R, Mc Kenna W, Vosberg HP, Seidman JG, Seidman CE. Alpha-tropomyosin and cardiac troponin T mutations cause familial hypertrophic cardiomyopathy: a disease of the sarcomere. *Cell* 1994;77:701-712.

Towbin JA, Bowles NE. The failing heart. *Nature* 2002;415:227-233

Vatta M, Mohapatra B, Jimenez S, Sanchez X, Faulkner G, Perles Z, Sinagra G, Lin JH, Vu TM, Zhou Q, Bowles KR, Di Lenarda A, Schimmenti L, Fox M, Chrisco MA, Murphy RT, McKenna W, Elliott P, Bowles NE, Chen J, Valle G, Towbin JA. Mutations in Cypher/ZASP in patients with dilated cardiomyopathy and left ventricular non-compaction. *J Am Coll Cardiol.* 2003;42:2014–2027.

Villard E, Duboscq-Bidot L, Charron P, Benaiche A, Conraads V, Sylvius N, Komajda M. Mutation screening in dilated cardiomyopathy: prominent role of the beta myosin heavy chain gene. *Eur Heart J.* 2005;26:794–803.

Xing Y; Ichida F; Matsuoka T; Isobe T; Ikemoto Y; Higaki T; Tsuji T; Haneda N; Kuwabara A; Chen R; Futatani T; Tsubata S; Watanabe S; Watanabe K; Hirono K; Uese K; Miyawaki Toshio ; Bowles KR. ; Bowles NE. ; Towbin JA.: Genetic analysis in patients with left ventricular noncompaction and evidence for genetic heterogeneity. *Mol Genet Metab* 2006;88:71–7.

Anhang

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Felix Berger, der mir die Möglichkeit zur Durchführung der Habilitation an seiner Abteilung gegeben hat. Danken möchte ich auch Herrn Prof. Dr. Ludwig Thierfelder. Er hat mich in die molekulargenetischen Ansätze eingeführt und die maßgeblichen Arbeiten für diese Habilitationsschrift in seiner Gruppe am Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin ermöglicht und gefördert. Für die langjährige und gute Zusammenarbeit danke ich Frau Dr. Brenda Gerull, Berlin; Herrn PD Dr. Erwin Oechslin, Toronto, Kanada und Herrn Prof. Rolf Jenni, Zürich, Schweiz. Für die gute Zusammenarbeit im Labor bedanke ich mich bei Dr. Andrea Töppel und Dr. Susanne Probst, die beide ihre Doktorarbeit im Laufe der Zusammenarbeit angefertigt haben. Den Patienten, die an den genetischen Untersuchungen teilnahmen, danke ich herzlich für das entgegengebrachte Vertrauen. Für die Forschungsförderung möchte ich mich bei der Deutschen Forschungsgemeinschaft bedanken. Meiner Familie danke ich für ihre Unterstützung und meinem Ehemann Egbert Klaassen danke ich außerdem für die ausgezeichnete EDV-technische Assistenz und praktischen Rat.

Erklärung

§ 4 Abs. 3 (k) der HabOMed der Charité

Hiermit erkläre ich, daß

- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wurde,
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfasst, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern/ Wissenschaftlerinnen und mit technischen Hilfskräften sowie die verwendete Literatur vollständig in der Habilitationsschrift angegeben wurden.
- mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

Datum

Unterschrift