

4. Diskussion

In einer konsekutiven Patientengruppe (n=108), bestehend aus familiären und sporadischen Fällen von hypertropher Kardiomyopathie, wurde systematisch eine Mutationsanalyse in den MYH7-, MYBPC3-, TNNT2-, TNNI3-, TPM1- und TNNC3-Genen durchgeführt. Die bislang publizierten Studien über Schätzungen von Mutationshäufigkeiten basierten bisher hauptsächlich auf Familienstudien [59]. Unser Ziel war es Mutationsart und Häufigkeit bei einer großen Auswahl nichtverwandter Patienten festzustellen.

Das Ergebnis der Screeninguntersuchung ergab, dass eine höhere Mutationsrate (18,5%) im MYBPC Gen (20 Mutationen bei 108 Patienten), als im MYH7 (13%) (14 Mutationen bei 108 Patienten) zu verzeichnen war. Dieses Ergebnis scheint im Vergleich zu der in der Literatur beschriebenen Mutationshäufigkeit stark zu variieren. In den bisher veröffentlichten Studien war das β -Myosin-Schwerkette Gen mit 35% aller identifizierten Mutationen am häufigsten betroffen [15, 32, 73].

Eine Erklärung wäre, dass sich die Aussagen in der Literatur auf Häufigkeiten aus Erhebungen in Familien beziehen. Das untersuchte Kollektiv (n=108) hatte ein viel höheren Anteil an Patienten mit sporadisch aufgetretener HCM (55%), als mit familiär bedingter HCM (45%).

Die systematische Mutationsüberprüfung ermöglichte eine positive genetische Diagnose bei jedem dritten der 108 nichtverwandten Patienten und bei mehr als die Hälfte der Patienten mit HCM in der Familie [76]. Die Mutationsrate und das –spektrum bei den analysierten Genen waren sehr unterschiedlich. Das **MYBPC-Gen** (Exon 6-34) war mit insgesamt 18 Mutationen bei 20 Patienten am häufigsten betroffen. Diese Mutationen waren von einem außerordentlichen breiten Spektrum (acht Aminosäuresubstitutionen, drei Spleicemutationen, eine Nonsensemutation und je drei Insertionen und Deletionen).

Diskussion

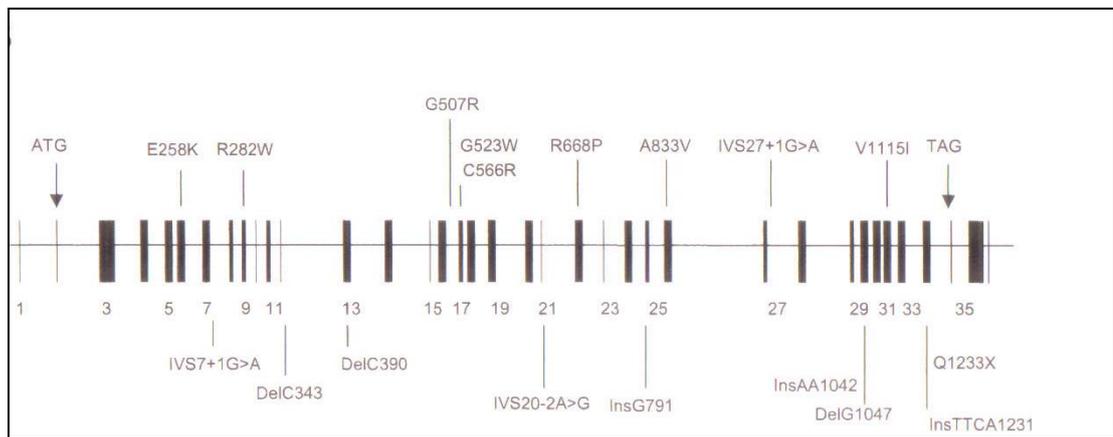


Abbildung 28: MYBPC-Gen mit eingezeichneten Mutationen

Mutationen im Bereich des **Troponin Komplexes** fanden sich sehr selten in unserer Patientengruppe und machen weniger als zwei Prozent der Mutationen aus (2:108). Die beiden Missensemutationen (Arg 278 Pro, Lys 253 Arg) in den Genen des Troponinkomplexes wurden infolge der Position bei gut erhaltener Proteinregion als pathologisch angesehen.

Dieses Resultat steht in Diskrepanz zu den bisher veröffentlichten Studienergebnissen, wonach zu den wichtigen Gendefekten mit ca. 15% das Troponin T und mit 3% das α -Tropomyosin Gen [73] gehören. Daraus ergibt sich die Annahme, dass die in der Literatur beschriebene krankheitsverursachende Mutationsfrequenz im Troponin T Gen, geringer ist. Um diese Annahme zu bestätigen wäre ein größeres Patientenkollektiv erforderlich.

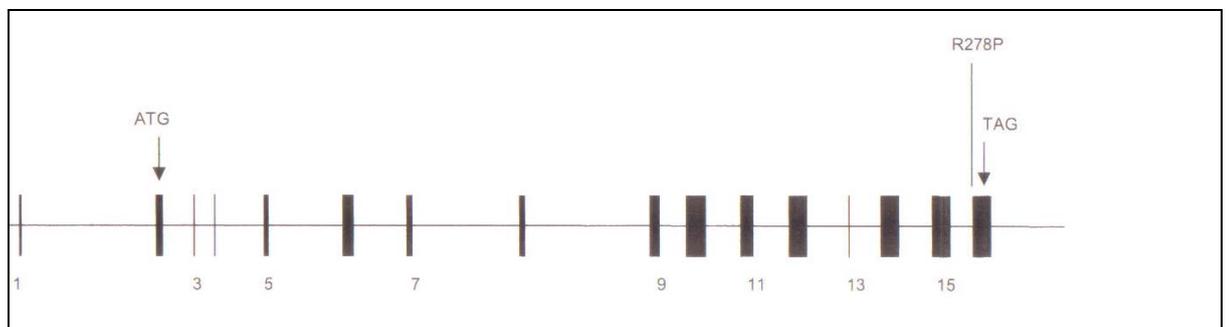


Abbildung 29: Troponin T mit der eingezeichneten Mutation

Bei einer Patientin führte man die Progression von HCM bei ausgedehnter Kardiomyopathie in jungen Jahren auf eine identifizierte Missensemutation im **TPM1** zurück [74]. Ähnliches wurde bei japanischen Familien [75] und u.a.

von Thierfelder beschriebenen Familien [21] gefunden. Somit könnte TPM1-Variante für die Entwicklung dieser Phänotyp-Variante von HCM eine grosse Rolle gespielt haben.

Im Gegensatz zum MYBPC3 beschränkt sich das Spektrum an Mutationsarten bei **MYH7** fast ausschließlich auf Missensemutationen, die zu einem Aminosäureaustausch führen, nicht aber das Leseraster verändern. Es lässt sich vermuten, dass andere Mutationen mit der Entwicklung funktioneller Sarkomere nicht vereinbar sind und deshalb schon frühzeitig (im Uterus) zum Tod führen [44, 76].

Nach dem Mutationsprofil sind ca. 70% der pathologisch relevanten genetischen Änderungen einzigartige Mutationen. Lediglich zwei Mutationen bei MYH7 (R403W und R719W) werden mehr als dreimal in der Literatur beschrieben, neun Mutationen werden mehr als einmal erwähnt [76].

Die vorliegende Studie erfolgte, um das Spektrum und die Häufigkeit von HCM-verursachenden Mutationen bei einer klinisch relevanten Kohorte betroffener Patienten, zusätzlich zu den bisherigen Familienuntersuchungen, zu bewerten. Es wurde davon ausgegangen, dass es sich bei der überprüften Kohorte um eine für die HCM homogene Gruppe handelte. Die Bestätigung hierfür erfolgte durch die nahezu gleichmäßige Verteilung der klinischen Symptome und der Notwendigkeit von invasiven Therapien bei diversen Untergruppen unserer Patientenkohorte. Patienten ohne festgestellte Mutationen waren nach echokardiographischen und angiographischen Parametern typische HCM-Fälle. Bei ihnen waren invasive Therapien erforderlich. Allerdings gab es hier im geringem Umfang eine belastete Familienanamnese. Sie erwiesen sich als sporadische Fälle. Dies ist möglicherweise darauf zurückzuführen, dass die bekannten HCM-Gene aus Familienstudien stammen und lässt vermuten, dass andere genetische Ursachen zum sporadischem Auftreten der Krankheit führen.

In dem Patientenkollektiv (n:108) wurden insgesamt 20 Mutationen im MYBPC- Gen identifiziert (11 Trunkationen und 9 Missensemutationen).

Die 20 Index-Patienten mit Mutationen im MYBP C Gen zeigten früher im Vergleich zu den übrigen 88 von 108 konsekutiven Patienten klassische Symptome für eine HCM. Sie brauchten häufiger eine ICD Implantation, um lebensbedrohliche Arrhythmien zu behandeln. Der Grad der Hypertrophie und die Notwendigkeit für Myektomie bzw. Tash schienen nicht vergleichbar zu sein.

Bei den Missensemutationen lag das Erstdiagnosealter bei 43 ± 13 Jahren, und bei den Truncationen bei 34 ± 11 Jahren. Sie tendieren somit zu einem früheren Krankheitsbeginn (34 ± 11 Jahren vs. 43 ± 13 Jahren, $p=0.06$) und benötigen häufiger therapeutische Maßnahmen (Septal-Ablation, ICD-Implantation; $8/11$ vs. $4/9$, $p=0.005$). Die Träger von Truncationen weisen auch häufiger eine pos. Familienanamnese auf, als die Träger der Missensemutationen (82% vs. 67%) (

Diese Analyse der Untergruppen von Patienten mit Mutationen bestätigt die Unterschiede der verschiedenen Mutationsarten. Bei Patienten mit Missense Mutationen im MYBPC Gen kommt es zu einem verzögerten Ausbruch der Krankheit mit besseren klinischen Verlauf, als bei den Patienten mit Trunkationen [77].

4.1 Sensitivität der Methoden

4.1.1 SSCP-Methoden

Zur Suche nach Mutationen und Polymorphismen wurde die SSCP-Analyse (single-strand-conformational-polymorphism) durchgeführt. Bei dieser Methode werden die PCR-Fragmente durch Hitze denaturiert, und anschließend werden die einzelsträngigen DNA-Fragmente unter nicht-denaturierenden Bedingungen elektrophoretisch aufgetrennt. Die Genauigkeit der SSCP-Analyse ist abhängig von der Länge des Fragments, von der Temperatur und der ionischen Kraft. Bei einer Produktlänge von 100-200bp werden bei der Analyse von Laufveränderungen über 80% erkannt [65,87]. Bei über 200bp. nimmt die Sensitivität ab. Um die Sensitivität noch zu erhöhen wurde in der vorliegenden Arbeit die Analyse von den PCR

Amplifikationen unter 2 verschiedenen Temperaturen (4°C und Raumtempertur) durchgeführt.

Der Vorteil der Analyse besteht darin, dass ein Gen auch bei nicht bekannter Struktur schnell durchgemustert werden kann. Es können beliebige Primer verwendet werden und die Methode lässt sich an große Probemengen anpassen.

Das veränderte Laufverhalten und die damit vermutete Mutationen müssen durch weitere Analysen bestätigt werden. Da diese Methode nur eine Sensitivität von ca. 90% besitzt, wäre es möglich, dass Mutationen übersehen werden. Untersuchungen mit der DHPLC-Methodik mit einer 100%igen Sensitivität konnten bestätigen, dass die SSCP-Methode im Vergleich zu anderen Methoden eine sehr hohe Sensitivität besitzt, so dass es daher eher unwahrscheinlich erscheint, Mutationen bei dem vorliegendem Patientenkollektiv zu übersehen.

4.1.2 Sequenzierung

Zum Zeitpunkt der Untersuchung war die Sequenzierung der DNA die sensitivste Methode zum Nachweis von Mutationen.

Sie dient der Ermittlung der Nukleotidsequenz von PCR-Produkten, die z.B. in der SSCP-Analyse ein aberrantes Bandenmuster aufweisen. Die Sequenzierung selbst hat als Screening-Methode für Mutationen eine hohe Detektionsrate.

Als Nachteil ist zu erwähnen, dass dieses Analyseverfahren sehr arbeitsaufwendig für das Durchmustern der Gene vieler Personen oder vieler verschiedener Gene ist. Um Mutationen genau festlegen zu können oder sie zu bestätigen, ist dieses Verfahren unerlässlich. Fehler sind jedoch auch bei dieser Methode möglich.

Das erstellte Mutationsprofil zeigt, dass auf DNA gestützte Mutationsuntersuchung bei erfassten Patienten die Verwendung der SSCP-Analyse geeignet ist und zur Entdeckung kausaler Mutationen führt. Hierbei handelt es sich um mindestens ein Drittel Nichtver-

Diskussion

wandter und bei jedem zweiten Patienten mit vorbelasteter Familienanamnese. Die Mutationsprüfung ermöglicht eine zweifelsfreie Diagnose bei gefährdeten Angehörigen derartiger Familien. Im untersuchten Kollektiv berichteten 28 von den 36 Mutationsträgern (78%) von einer belasteten Familienanamnese mit zumindest einem betroffenen Verwandten ersten Grades. Lediglich acht Mutationen vollzogen sich sporadisch. In allen mutationspositiven Familien wurde die pathologische Mutation bei zumindest einem weiteren Verwandten festgestellt. Somit verbessern die molekulargenetischen Untersuchungen, gezielt die Patientenversorgung und genetische Beratung bei dieser Krankheit.