

Aus dem Center for Cardiovascular Research
der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Melusin – Kandidatengen im Kontext kardialer Hypertrophie und
Primärer Kardiomyopathien**

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Bettina Wächter
aus Jena

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. V. Regitz-Zagrosek
2. Prof. Dr. med. B. Pieske
3. Priv.-Doz. Dr. rer. nat. J. Erdmann

Datum der Promotion: 26.02.2007

Zusammenfassung

Mit vorliegender Arbeit wurde das Zytoskelett-assoziierte Protein Melusin als Kandidatengen primärer Kardiomyopathien untersucht. Melusin ist wesentlich involviert in die Hypertrophieentwicklung nach mechanischer Belastung. Bei Kardiomyopathien sind hypertrophe Reaktionen von größter pathogenetischer Wichtigkeit. Daher etablierten wir zunächst eine auf PCR, SSCP-Analyse und Sequenzierung beruhende Screening-Methode des Melusin-Gens und untersuchten daraufhin 192 an einer primären HCM bzw. DCM erkrankte, nicht verwandte Probanden auf Vorliegen einer Mutation im Melusin. Unter den 106 HCM-Patienten fanden wir eine Mutation, die aufgrund eines Aminosäureaustauschs funktionelle Relevanz besitzen könnte. In der Familie der betroffenen Patientin wurden weitere Merkmalsträger identifiziert. Eine eindeutige Zuordnung zur klinischen Ausprägung einer HCM konnte nicht beobachtet werden, was allerdings an der Altersabhängigkeit des Auftretens von initialen Krankheitssymptomen oder einer inkompletten Penetranz liegen könnte. In einem Intron wurde eine weitere Mutation bei einem HCM-Patienten entdeckt. In der Gruppe der untersuchten DCM-Patienten fand sich keine Variante. Auch das Fehlen weiterer genetischer Alterationen im Melusin-Gen ist wichtiges Ergebnis vorliegender Untersuchung. So kann man aufgrund der genetisch hohen Konservierung von einer besonderen Bedeutung des Melusin in Kardiomyozyten ausgehen. Die Rolle des Melusin bei der Genese von Hypertrophie im Rahmen der primären Kardiomyopathien kann mittels vorliegender Ergebnisse nicht abschließend beurteilt werden. Ein Eingebundensein des Melusin in die Hypertrophie-Pathogenese in humanem Myokard erscheint jedoch wahrscheinlich; um Licht in die genaue Bedeutung des Melusin zu bringen, sind allerdings weitere Untersuchungen notwendig. Interessante Studienziele sind u.a. eine mögliche Interaktion des Melusin mit Hsp90, dem Calcineurin-Signalweg und dem Komplex um T-cap/MLP. Zur Regulierung des Melusin werden Informationen über das Bindungsverhalten ans Integrin *in vivo* benötigt. Diesbezügliche Erkenntnisse könnten nicht nur zum näheren Verständnis der Signalwege sondern auch bezüglich einer therapeutischen Beeinflussung kardialer Hypertrophie, die nicht nur bei Kardiomyopathien klinisch von höchster Relevanz ist, hilfreich sein.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Kardiomyopathien	1
1.1.1	Definition der Kardiomyopathien	1
1.1.2	Formen der Herzhypertrophie	2
1.1.3	Klinik der Kardiomyopathien	3
1.1.3.1	Klinik der Hypertrophischen Kardiomyopathie	3
1.1.3.2	Klinik der Dilatativen Kardiomyopathie	3
1.1.4	Diagnostik und Therapie der Kardiomyopathien	4
1.1.5	Genetik der Kardiomyopathien	4
1.1.5.1	Kandidatengene	5
1.1.5.2	Genetik der Hypertrophischen Kardiomyopathie	6
1.1.5.3	Genetik der Dilatativen Kardiomyopathie	6
1.1.5.4	Auswirkung der Mutationen	7
1.2	Melusin	8
1.2.1	Gen- und Proteinstruktur	8
1.2.2	Kardiale Wirkung	9
1.2.3	Signaltransduktion	10
1.3	Herzmuskulatur	12
1.3.1	Die Herzmuskelzelle - das Sarkomer	12
1.3.1.1	Kontraktile Proteine	12
1.3.1.2	Strukturproteine	13
1.3.2	Extrazelluläre Matrix	14
1.4	Verbindung zwischen intra- und extrazellulärem Raum – Integrine	15
1.5	Hitzeschockproteine – Chaperone	16
1.6	CHORD – Proteine	17
1.7	Fragestellung	17
2	Material und Methoden	19
2.1	Probanden	19
2.2	Chemikalien	20

2.3	Puffer und Lösungen	21
2.4	Geräte	23
2.5	Verbrauchsmaterialien	24
2.6	Polymerase-Ketten-Reaktion	24
2.7	Single Strand Confirmation Polymorphism (SSCP)	25
2.8	DNA-Aufarbeitung	26
2.9	Sequenzierung	27
2.10	Restriktionsverdau	27
2.11	PCR Troponin T	28
2.12	Statistik	28
3	Ergebnisse	30
3.1	Etablierung des Mutationsscreenings im Melusingen	30
3.1.1	PCR	30
3.1.2	Kontrolle der Amplifikate	32
3.1.2.1	Restriktionverdau	32
3.1.2.2	Sequenzierung	33
3.1.3	SSCP-Analyse	33
3.2	Häufigkeit von Sequenzvarianten in den 11 Exons des Melusingen	35
3.2.1	Ergebnis SSCP in den 11 Exons bei HCM und DCM	35
3.2.1.1	Vergleich der Häufigkeit Patienten und Kontrollen	35
3.2.2	Identifizierung der Variante im Exon 1	38
3.2.2.1	Restriktionsverdau	40
3.2.3	Identifizierung der Variante im Exon 6	40
3.3	Abschätzung der Bedeutung der Varianten für das Krankheitsgeschehen	41
3.3.1	Mutation Exon 1	41
3.3.1.1	Krankengeschichte der Indexpatientin	41
3.3.1.2	Echokardiografische Untersuchung der Familie der Indexpatientin	42
3.3.1.3	Untersuchung der Familie der Indexpatientin mittels Restriktionsverdau	43
3.3.1.4	Troponin T	45
3.3.1.5	Stammbaum der Familie der Indexpatientin	47
3.3.1.6	Homologien Exon 1	48

3.3.2	Mutation Exon 6	51
4	Diskussion	52
4.1	Methode	52
4.2	Melusin als Kandidatengen für die Genese von Kardiomyopathien	53
4.3	Mutation Intron 6	54
4.4	Mutation Exon 1	55
4.4.1	Klinische Daten	55
4.4.2	Troponin T	56
4.4.3	Mögliche Auswirkungen der Mutation	57
4.5	Hypertrophie und Herzinsuffizienz	58
4.6	Mechanotransduktion der Herzmuskulatur	60
4.6.1	Z-Scheibe und Zytoskelett	61
4.6.2	Integrine	64
4.6.3	Extrazelluläre Matrix	65
4.6.4	Involvierte Signaltransduktionsmoleküle	66
4.6.4.1	Beeinflussung des Zellwachstums durch Akt und GSK-3 β	67
4.6.4.1	Signalgebung durch GSK-3 β	68
4.7	Calcium-Regulator des Myozytenwachstums	70
4.8	CHORD-Domäne	71
4.9	Hitzeschockproteine – Chaperone	72
4.9.1	Melusin als möglicher Interaktionspartner von Hsp90	74
4.10	Hypertonus und Melusin	76
4.11	Zusammenfassung	76
5	Literaturverzeichnis	78
6	Anhang	87
6.1	Abkürzungsverzeichnis	87
6.2	Tabellenverzeichnis	90
6.3	Abbildungsverzeichnis	92

Erklärung

Ich, Bettina Wächter, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „Melusin – Kandidatengen im Kontext kardialer Hypertrophie und Primärer Kardiomyopathien“ selbst verfasst habe, keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und die Arbeit ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst habe und dass auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt sind.

Berlin, den 20.04.2006

Bettina Wächter

Danksagung

Frau Prof. Dr. med. V. Regitz-Zagrosek möchte ich für die Überlassung des Themas und die Anregungen bei der Anfertigung dieser Arbeit danken. Frau Dr. A. Doller danke ich für die Betreuung während der Laborarbeit und darüber hinaus, Frau J. Milde für die Sequenzierung der Proben und die Zusammenarbeit im Labor.

Ganz herzlich möchte ich Inga Petruschke und Robert Kindler für motivierende und aktive Hilfe danken.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern ohne deren Unterstützung diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Lebenslauf

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