

### 3 Ergebnisse

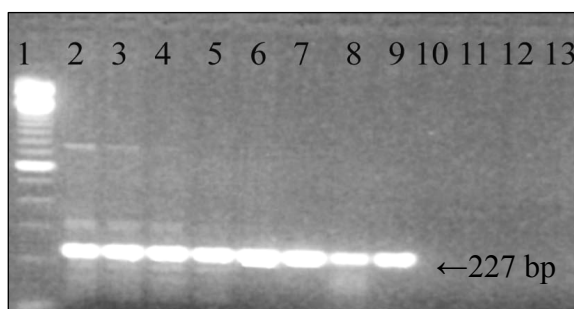
#### 3.1 Etablierung des Mutationsscreenings im Melusingen

##### 3.1.1 PCR

Die verwendeten Primer zur Amplifikation der einzelnen Exons wurden aus der Sequenz des Melusins bestimmt. Die genaue Lage der Exons wie der Primer im Gen kann der Datenbank entnommen werden (Accnr.: NP\_036410.1 NCBI). Der Hersteller war die Firma BioTeZ Berlin-Buch GmbH. Die Primersequenzen lassen sich Tabelle 3.1 entnehmen.

Die entstandenen PCR-Amplifikate schließen neben den Exons jeweils auch die Exon/Intron-Übergänge mit ein. Die Amplifikatlängen sind ebenfalls in Tabelle 3.1 zu finden.

Zur Optimierung der PCR für die einzelnen Exons wurde jeweils eine Gradienten-PCR durchgeführt. Der Gradient ging dabei über 20 °C, zunächst von 50 °C – 70 °C, nur im Falle der Exons 3 und 4 wurde aufgrund einer geringen Schmelztemperatur der Primer ein Gradient von 40 °C – 60 °C gewählt. Hier beispielhaft das Bild der Gradienten-PCR von Exon 6:



**Abb. 3.1:** Gradienten-PCR Exon 6, erste Spur: 100 bp-Marker, Spuren 2-13 PCR-Produkt (227 bp) bei unterschiedlichen Annealing-Temperaturen (siehe Text)

In der zweiten Spur ist das Produkt bei 50,0 °C aufgetragen, es folgen: 50,3 °C, 51,4 °C, 53,2 °C, 55,5 °C, 58,1 °C, 60,8 °C, 63,5 °C, 66,0 °C, 68,1 °C, 69,7 °C, 70,5 °C.

Man erkennt, dass in diesem Falle ab einer Temperatur von 66,0 °C (Spur 10) kein PCR-Produkt mehr entstand, bis einschließlich Spur 5 (53,2 °C) sind zusätzlich unspezifische Banden zu erkennen. Es wurde zur weiteren Arbeit eine Temperatur von 55 °C ausgewählt. Die optimierte Temperatur für die anderen Exons findet sich in folgender Tabelle:

Exon	Primer	Temperatur	Amplifikat
1 (63 bp)	ME Ex1 F: 5'-TCA ACC AAC GCT TCC ATG-3' ME Ex1 R: 5'-GGC TGT AAG ATC ACT CAG-3'	53 °C	214 bp
2 (49 bp)	ME Ex2 F: 5'-AAT TGG TCT GAG TGA TCT T-3' ME Ex2 R: 5'-CAG ATC AGC TTA GCT TCC-3'	53 °C	279 bp
3 (56 bp)	ME Ex3 F: 5'-GGA AGC TAA GCT GAT CTG-3' ME Ex3 R: 5'-CTA GTA TAG ATA AGG AGA-3'	46 °C	168 bp
4 (145 bp)	ME Ex4 F: 5'-ATT TAT GTA CTT GGA TTC-3' ME Ex4 R: 5'-CTA GTT CCC AGT CCT CAA-3'	46 °C	302 bp
5 (94 bp)	ME Ex5 F: 5'-AAC TAA ATC ACC ACC CTT-3' ME Ex5 R: 5'- ATT GCC ACT TCC ACT AAA-3'	55 °C	180 bp
6 (55 bp)	ME Ex6 F: 5'-TGA GTG GGG GGA TGG ATA-3' ME Ex6 R: 5'-AGG GCC TTG GTA AAC CTA-3'	55 °C	227 bp
7 (70 bp)	ME Ex7 F: 5'-CCC AGG ATG TGA TGC T-3' ME Ex7 R: 5'-GTA GGA AGA TAA TTC AAC TGA ATT-3'	58 °C	304 bp
8 (99 bp)	ME Ex8 F: 5'-GCT ATG AGG CTA TGA GAC-3' ME Ex8 R: 5'-TGG CTA TGT GGT ACA GAG-3'	55 °C	273 bp
9 (113 bp)	ME Ex9 F: 5'-CAC GTG CAT CAT GAG AAC-3' ME Ex9 R: 5'-CTC TGC CTG TGA GAT TGT-3'	56 °C	254 bp
10 (62 bp)	ME Ex10 F: 5'-CAA CCT GTG GAT CAT ACC-3' ME Ex10 R: 5'-TCC AGT CTA GCC GCT CTT-3'	56 °C	222 bp
11 (227 bp)	ME Ex11 F: 5'-CTC CTC CTC AGG TCA TAA-3' ME Ex11 R: 5'-TCA ACT GTC TGG TGT CAC-3'	53 °C	256 bp

**Tab. 3.1 :** Verwendete Primer mit optimierter Annealing-Temperatur und zugehöriger Länge der mittels PCR erhaltenen Amplifikate

### 3.1.2 Kontrolle der Amplifikate

#### 3.1.2.1 Restriktionverdau

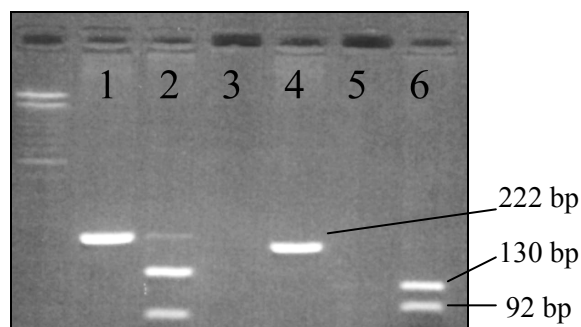
Zur Überprüfung auf Vorliegen des gewünschten Amplifikates wurde für jedes Exon ein Restriktionsverdau durchgeführt. Folgende Tabelle zeigt die verwendeten Restriktionsenzyme, ihre Erkennungssequenz und die im jeweiligen Amplifikat erwarteten Fragmentgrößen.

Exon	Restriktionsenzym	Erkennungssequenz	Fragmentgrößen
1	<i>Aci</i> I	5'-C/CGC-3' 3'-GGC/G-5'	53 und 161 bp
2	<i>Afl</i> II	5'-C/TTAAG-3' 3'-GAATT/C-5'	78 und 201 bp
3	<i>Dde</i> I	5'-C/TNAG-3' 3'-GANT/C-5'	72 und 96 bp
4	<i>Bfa</i> I	5'-C/TAG-3' 3'-GAT/C-5'	38, 68 und 196 bp
5	<i>Aci</i> I	5'-C/CGC-3' 3'-GGC/G-5'	53 und 127 bp
6	<i>Alu</i> I	5'-AG/CT-3' 3'-TG/GA-5'	77 und 150 bp
7	<i>Hae</i> III	5'-GG/CC-3' 3'-CC/GG-5'	135 und 169 bp
8	<i>Hinf</i> I	5'-G/ANTC-3' 3'-CTNA/G-5'	108 und 165 bp
9	<i>Aci</i> I	5'-C/CGC-3' 3'-GGC/G-5'	88 und 166 bp
10	<i>Dde</i> I	5'-C/TNAG-3' 3'-GANT/C-5'	92 und 130 bp
11	<i>Ava</i> I	5'-C/PyCGPuG-3' 3'-GPuGCPy/C-5'	52 und 204 bp

**Tab. 3.2:** Zur Amplifikatkontrolle verwendete Restriktionsenzyme mit erwarteten Fragmentgrößen

Als Kontrolle wurden, nach zweistündigem Verdau bei 37 °C, jeweils 5 µl unverdautes PCR-Amplifikat auf das Agarosegel aufgetragen.

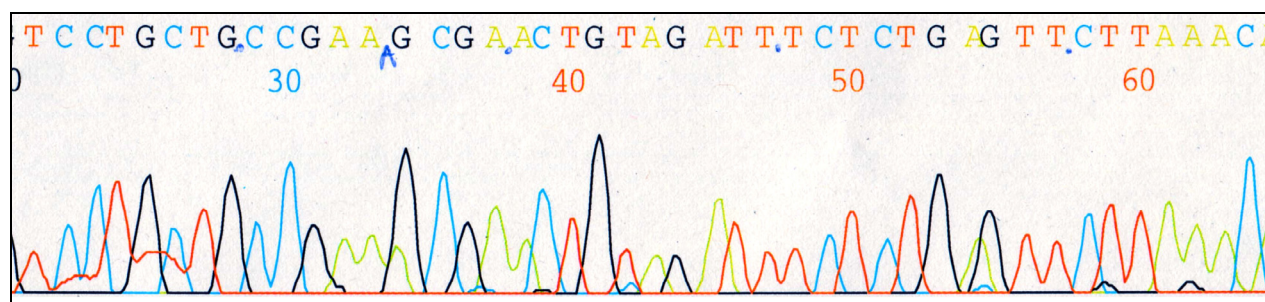
Hier beispielhaft das Bild des Restriktionsverdau für die Exons 9 und 10:



**Abb. 3.2:** Restriktionsverdau Exon 9 und 10, Spur 1: Exon 9 unverdaut (254 bp), Spur 2: Exon 9 verdaut (88 bp, 166 bp), Spur 4: Exon 10 unverdaut (222 bp), Spur 6: Exon 10 verdaut (92 bp, 130 bp)

### 3.1.2.2 Sequenzierung

Alle Produkte wurden exemplarisch für jedes einzelne Amplifikat jeweils einmal vorwärts und einmal rückwärts sequenziert. Hier ein Ausschnitt aus der Vorwärts-Sequenzierung des Amplifikates für Exon 3.

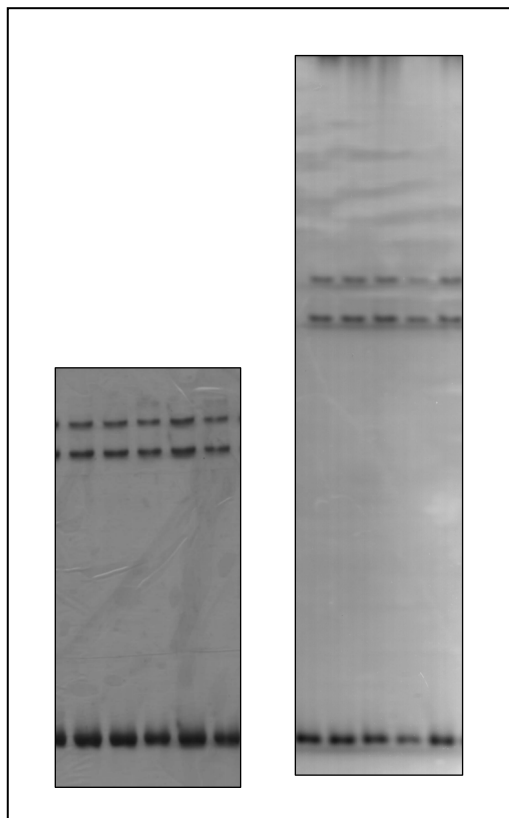


**Abb. 3.3:** Ausschnitt aus Vorwärtssequenzierung Exon 3

### 3.1.3 SSCP-Analyse

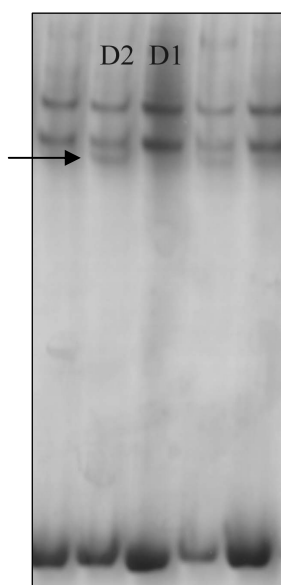
Jede DNA-Probe wurde für jedes Exon gesondert sowohl bei Raumtemperatur als auch bei 4°C mittels SSCP-Analyse untersucht. Dabei wurde nach dem Auftreten von unterschiedlichen Bandenmustern nach der Färbung der Gele gesucht. Hier beispielhaft ein sich ergebendes Bild bei

Raumtemperatur und zum Vergleich die gleichen Proben nach SSCP-Analyse bei 4 °C. Die Proben zeigen sämtlich das gleiche Laufverhalten.



**Abb.3.4:** Laufverhalten im SSCP-Gel bei 4 °C links, rechts bei Raumtemperatur, als Beispiel wurde das Amplifikat (273 bp) von Exon 8 gewählt. Die vermeintlich unterschiedliche Größe der Gele resultiert aus der differierenden Laufstrecke bei den beiden gewählten Temperaturen.

In einigen Fällen schien ein differierendes Laufverhalten vorzuliegen, wie in folgendem Beispiel.



**Abb. 3.5:** Laufverhalten im SSCP-Gel bei 4°C, Exon 1. Spur mit Probe D1 zeigt eine Bande weniger als die benachbarte Spur mit Probe D2

Von diesen Proben wurde eine erneute PCR angefertigt und die SSCP-Analyse wiederholt. Bestätigte sich die Auffälligkeit im Laufverhalten wurde eine Überprüfung mittels Sequenzierung vorgenommen. Im Beispiel aus Abbildung 3.5 lag keine Mutation vor, es handelt sich um einen falschpositiven Befund.

## **3.2 Häufigkeit von Sequenzvarianten in den 11 Exons des Melusingen**

### **3.2.1 Ergebnis SSCP in den 11 Exons bei HCM und DCM**

Bei der SSCP-Untersuchung der 11 Exons des Melusin fanden sich lediglich 2 Veränderungen. Eine dieser Veränderungen befindet sich in einem Intron (s. 3.2.3), die andere befindet sich in einem Exon (s. 3.2.2) und bewirkt einen Aminosäureaustausch.

Das Fehlen weiterer Varianten oder Mutationen ist ebenfalls ein wichtiges Ergebnis dieser Arbeit und verweist auf eine hohe Bedeutung des Melusin in der Herzmuskulatur. Zur genetischen Konservierung s. 3.3.1.6.

#### **3.2.1.1 Vergleich der Häufigkeit Patienten und Kontrollen**

Nach dem Hardy-Weinberg-Gesetz gilt folgender statistischer Zusammenhang:

$$p^2 + 2pq + q^2 = 1$$

Für das Melusin ergibt sich die Besonderheit, dass es X-chromosomal lokalisiert ist und demzufolge diese Formel nur für das weibliche Geschlecht anzuwenden ist. Für das männliche Geschlecht gilt, dass nur Hemizygotie vorliegen kann und somit die Merkmalsfrequenz direkt der Allelfrequenz entspricht.

Für die unter 3.2.2 beschriebene Mutation im Exon 1 in der untersuchten weiblichen Probandenpopulation wurden die erwarteten Häufigkeiten errechnet ( $q$  = Häufigkeit von CC +  $\frac{1}{2}$  Häufigkeit CT), Allel C entspricht dem Wildtyp, Allel T der Mutation. Die gefundene Mutation ist heterozygot, ein Allel Cytosin wird durch Thymin ersetzt.

Nullhypothese  $H_0$ : Zwischen Kontrollgruppe und Patientengruppe besteht kein Unterschied bezüglich der Häufigkeit des Auftretens der Mutation; zu beobachtende Unterschiede sind rein zufälliger Natur.

Die genetische Veränderung an Position 37 kam nur einmal in der Gesamtgruppe von 61 weiblichen Probanden vor, d.h., dass diese Veränderung 0,82 % aller Melusin-Allele betraf, 1,64 % aller Patientinnen. Veränderungen die weniger als 5 % Häufigkeit aufweisen, nennt man Mutation.

Nach dem Hardy-Weinberg Equilibrium gelten für die Mutation folgende in nachfolgenden Tabellen zusammengestellten Genotyp- und Allelfrequenzen.

	TT	CT	CC	p	Q
	(p <sup>2</sup> )	(2pq)	(q <sup>2</sup> )		
Gefundene Häufigkeit	0	1,6393	98,3607	0,8197	99,1803
Erwartete Häufigkeit (H.W.)	0,0067	1,6260	98,3607		

**Tab. 3.3:** Gefundene und nach Hardy-Weinberg erwartete Häufigkeiten in Prozent für die gefundene Mutation in Exon 1 bei den untersuchten weiblichen Probanden (n = 61), T-Mutationsallel, C-Wildtypallel.

	beobachtet			erwartet		
		Kontrollen	Gesamtgruppe weibl. Patienten		Kontrollen	Gesamtgruppe weibl. Patienten
<b>Allel 1 (37C)</b>		190 (100)	121 (99,18)		188,4	121,0
<b>Allel 2 (37T)</b>		0(0)	1 (0,82)		1,6	1,0
<b>p (nach Fishers-Exakt)</b>						0.391

**Tab. 3.4:** Gegenüberstellung der beobachteten und erwarteten Allelfrequenzen nach dem Hardy-Weinberg-Gesetz für die Basenpaarsubstitution C zu T an Position 37

Es erscheint sinnvoll die Häufigkeiten zusätzlich separat für die Krankheitsentität der HCM-Gruppe zu erstellen.

Die beschriebene Mutation an Position 37 im Exon 1 des Melusins kam einmal in der Gruppe der HCM-Patienten mit 41 weiblichen Probanden vor, d.h., dass diese Veränderung bei 2.44% der Patientinnen vorlag, die Allelfrequenz beträgt 1,22 % der Melusin-Allele.

Für die Gesamtgruppe der HCM-Patienten fand sich eine Allelfrequenz von 0,6849 % und ein

Auftreten der Mutation bei 0,9434 % der Patienten. Aufgrund der X-chromosomalen Lokalisation ist eine geschlechtsgetrennte Auswertung jedoch sinnvoll. Da bei keinem der männlichen Probanden die fragliche Mutation gefunden wurde, ist die Allelhäufigkeit für diese Gruppe gleich Null. Weitere Tests erübrigen sich somit.

Nach dem Hardy-Weinberg Equilibrium gelten bzgl. der Mutation für die untersuchte weibliche HCM-Gruppe folgende in nachfolgenden Tabellen zusammengestellten Genotyp- und Allelfrequenzen.

	TT	CT	CC	p	Q
	(p <sup>2</sup> )	(2pq)	(q <sup>2</sup> )		
Gefundene Häufigkeit	0	2.4390	97,5610	1,2195	98,7805
Erwartete Häufigkeit (H.W.)	0,0067	2,4093	97,5610		

**Tab. 3.5:** Gefundene und nach Hardy-Weinberg erwartete Häufigkeiten in Prozent für die gefundene Mutation in Exon 1 bei den untersuchten weiblichen HCM-Probanden (n = 41), T-Mutationsallel, C-Wildtypallel.

	beobachtet		erwartet	
	Kontrollen	weibl. HCM-Patienten	Kontrollen	weibl. HCM-Patienten
<b>Allel 1 (37C)</b>	190 (100)	81(97,57)	187,68	81,0
<b>Allel 2 (37T)</b>	0 (0)	1 (1,22)	2,32	1,0
<b>p (nach Fischers-Exakt)</b>				0.302

**Tab. 3.6:** Gegenüberstellung der beobachteten und erwarteten Allelfrequenzen nach dem Hardy-Weinberg-Gesetz für die Basenpaarsubstitution C zu T an Position 37 bei weiblichen HCM-Patientinnen

Ein Vergleich zwischen den beobachteten und den nach dem Hardy-Weinberg-Equilibrium zu erwartenden Allelfrequenzen zeigt keine Tendenz zum häufigeren Auftreten der Mutation in der Gruppe der Patienten. Da die Bedingungen für die Anwendungen des ChiTest nicht gegeben sind, wurden genauere statistische Berechnungen mittels Fischers exaktem Test ermittelt. Es wurde nach einem signifikanten Unterschied zwischen erwarteten und gefundenen Häufigkeiten gesucht.

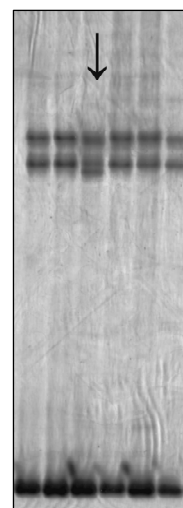


Fishers exakter Test: 
$$P = \frac{(a+b)!(c+d)!(a+c)!(b+d)!}{n!} \sum_i \frac{1}{a_i!b_i!c_i!d_i!}$$

Bei Betrachtung nach Fishers exaktem Test (siehe Tab. 3.4 bzw. 3.6) ergab sich bei einer angenommenen Irrtumswahrscheinlichkeit von 0,05 weder in der weiblichen Gesamtgruppe noch in der HCM-Patientinnen-Gruppe Signifikanz. Das heisst, dass  $H_0$  nicht verworfen werden kann, es besteht also entweder kein Unterschied zwischen den Gruppen, oder aber er kann auf Grund der Fallzahl nicht gezeigt werden.

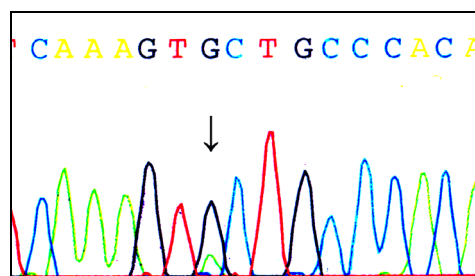
### 3.2.2 Identifizierung der Variante im Exon 1

Bei einer Probandin zeigt sich bei der SSCP-Analyse von Exon 1 unter Raumtemperaturbedingungen folgendes Bild:



**Abb. 3.6:** SSCP Exon 1 bei Raumtemperatur, durch den Pfeil markiert ist eine Spur, in der eine zusätzliche dritte Bande zu sehen ist

Die nachfolgende Sequenzierung bestätigte das Vorliegen einer Mutation. Hier ein Ausschnitt aus der Originalsequenz (mit dem reverse primer):



**Abb. 3.7:** Ausschnitt aus der Rückwärtssequenzierung der markierten Probe aus Abb.3.6 für das Exon 1, der Pfeil zeigt auf einen Doppelpik im Chromatogramm – es ist sowohl ein Signal für Guanin (schwarz), als auch ein darunterliegendes schwächeres Signal für Adenosin (grünelb) zu erkennen.

Die Vorwärtssequenzierung ergab aus einer unabhängigen Probe die selbige Veränderung. Da im sequenzierten PCR-Amplifikat an der fraglichen Stelle zwei verschiedene Basen vorliegen, Cytosin und Thymin, liegt eine heterozygote Mutation vor.

Die Mutation befindet sich innerhalb des Exon 1 an Nukleotidposition 37. Es handelt sich um eine Transition der Pyrimidinbase Cytosin in Thymin. Hier eine Übersicht über die Sequenz im Exon 1, das für die gefundene Mutation relevante Basentriplett ist hervorgehoben:

1-atg tct cta ctc tgt cgt aac aaa ggc tgt ggg cag **cac** ttt gac cct aat acc aac ctt cct

↓

1-atg tct cta ctc tgt cgt aac aaa ggc tgt ggg cag **tac** ttt gac cct aat acc aac ctt cct

Die Mutation bewirkt einen Aminosäureaustausch, Histidin wird durch Tyrosin ersetzt. Die vom Exon 1 kodierte Proteinsequenz ist in nachfolgender Aufstellung dargestellt. Die mutierte Aminosäure ist hervorgehoben:

M S L L C R N K G C G Q **H** F D P N T N L L

↓

M S L L C R N K G C G Q **Y** F D P N T N L L

Sowohl Histidin als auch Tyrosin sind Aminosäuren mit einer aromatischen Seitenkette, die jedoch unterschiedlich geladen sind – im Falle von Histidin positiv, Tyrosin dagegen negativ.

### 3.2.2.1 Restriktionsverdau

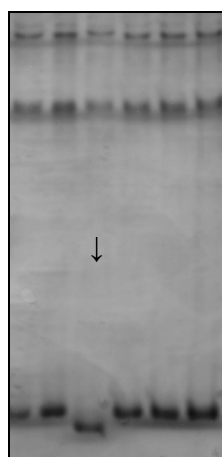
Für den Nachweis der in Exon 1 gefundenen Mutation wurde das Restriktionsenzym *Rsa* I verwendet, es schneidet spezifisch an der Stelle: 5'-GT/AC-3' (entspricht 3'-GA/TC-5'). Diese Schnittstelle ist im Rahmen der Mutation entstanden, im Wildtyp existiert sie nicht. Man erhält bei vorhandener DNA-Veränderung zwei Fragmente von 52 und 157 bp Länge. Nicht an dieser Stelle mutierte PCR-Amplifikate sind 209 bp lang. Da Melusin X-chromosomal lokalisiert ist, ergibt sich folgende Verteilung der Fragmente nach Verdau:

Wildtyp	Mutation ♂	Mutation heterozygot ♀	Mutation homozygot ♀
209 bp		209 bp	
	157 bp	157 bp	157 bp
	52 bp	52 bp	52 bp

**Tab. 3.7:** Fragmentgrößen Exon 1 nach Restriktionsverdau mit *Rsa* I

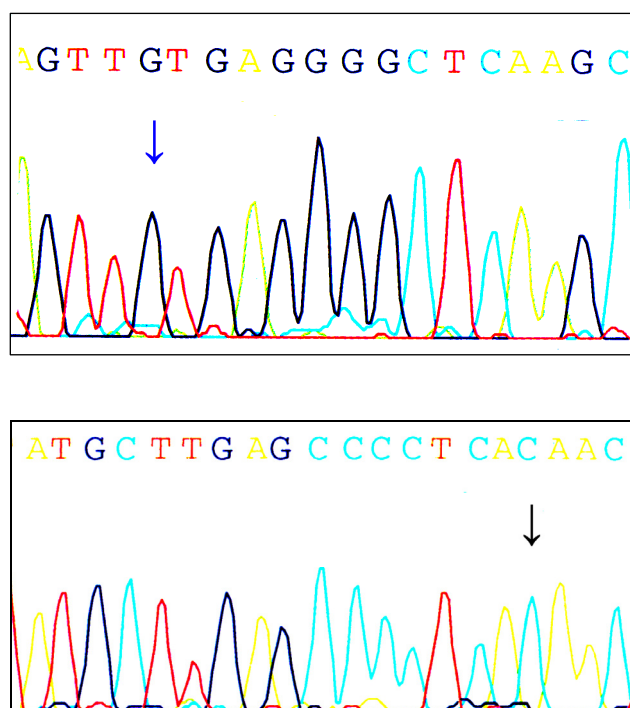
### 3.2.3 Identifizierung der Variante im Exon 6

Bei einem Probanden zeigte sich im SSCP-Gel für das Exon 6 folgendes Bild:



**Abb. 3.8:** SSCP-Gel von Exon 6, in der mit dem Pfeil markierten Spur, erkennt man eine im Vergleich zu den benachbarten Spuren weiter im Gel gewanderte Bande

Die daraufhin durchgeführte Sequenzierung ergab das Vorhandensein einer Mutation im angrenzenden Intron 6 des Melusin. Hier ein Sequenzausschnitt:



**Abb. 3.9:** Ausschnitt aus der Sequenzierung von Amplifikat für Exon 6, oben zu sehen ein Ausschnitt aus der Vorwärtssequenzierung, unten aus der Rückwärtssequenzierung, mit Pfeil markiert ist jeweils die mutierte Position

Im Vergleich zur Originalsequenz ergab sich bei diesem Patienten eine Abweichung an Position 14 im Intron 6. Dort ist Thymin durch Guanin ersetzt. Es handelt sich um einen männlichen Probanden, es liegt also eine hemizygoter Mutation vor. Aufgrund der Lage in einem Intron außerhalb der Spleißstellen wurde auf weitergehende Untersuchungen in diesem Fall verzichtet.

### 3.3 Abschätzung der Bedeutung der Varianten für das Krankheitsgeschehen

#### 3.3.1 Mutation Exon 1

##### 3.3.1.1 Krankengeschichte der Indexpatientin

Die Patientin mit der oben erläuterten Mutation im Exon 1 des Melusins, im Folgenden als Indexpatientin bezeichnet, erkrankte im Alter von 38 Jahren an einer HCM. An kardiovaskulären Risikofaktoren weist sie eine Adipositas mit einem BMI von 30,1 auf. Bei einem klinisch nicht erkrankten Bruder wurde echokardiographisch eine bisher unbekannte Myokardhypertrophie mit einer Septumdicke von 18mm diagnostiziert, was als Hinweis für eine positive Familienanamnese gewertet werden kann. Bei der Indexpatientin liegen weder ein arterieller Hypertonus noch ein

Nikotinabusus vor. Auch eine Hyperlipoproteinämie oder ein Diabetes mellitus wurden nicht diagnostiziert.

Die Patientin erlitt im Alter von 48 Jahren erstmals Synkopen, die seitdem rezidivierend auftreten. Es sind bei ihr folgende Herzrhythmusstörungen bekannt: ventrikuläre Extrasystolen (formal LOWN IVb) und ein Rechtsschenkelblock. Bei EPU kann ein Vorhofflimmern induziert werden. Eine elektrische Kardioversion erfolgte bei symptomatischem intermittierenden Vorhofflattern im Alter von 53 Jahren. Die Patientin trägt keinen Schrittmacher.

Ergebnisse der transthorakalen Echokardiografie in nachstehender Tabelle.

Alter	IVS	LVEDD	LVESD	LVW	RV	LA max.	Aortenwurzel
52 Jahre	19 mm			10 mm	n	57 mm	21 mm
53 Jahre	16 mm	51 mm	29 mm	12 mm	n	50 mm	

**Tab. 3.8:** Echokardiografische Daten der Indexpatientin im Alter von 52 und 53 Jahren

Außerdem wurden bei der Untersuchung im Alter von 52 Jahren eine leichte Mitralklappeninsuffizienz, eine geringe Trikuspidalklappeninsuffizienz und ein leichter Perikarderguss nachgewiesen, die Aortenklappe erschien regelrecht.

An nicht kardialen Erkrankungen ist eine substitutionsbedürftige Hypothyreose bei Struma diffusa bekannt.

Zur Untersuchung eventuell vorhandener Relevanz der gefundenen Mutation für die Ausbildung einer Hypertrophischen Kardiomyopathie wurde eine klinische wie genetische Exploration der Familie der Indexpatientin notwendig.

### 3.3.1.2 Echokardiografische Untersuchung der Familie der Indexpatientin

Die drei Kinder der Patientin sind nicht erkrankt. Bei einem klinisch nicht erkrankten Bruder der Patientin wurde echokardiografisch eine beginnende HCM diagnostiziert.

Sohn 1 weist bis auf die positive Familienanamnese keine kardiovaskulären Risikofaktoren auf. Der BMI beträgt 22,3. Bis auf einen gelegentlich auftretenden orthostatischen Schwindel hat er keinerlei gesundheitliche Probleme. Im EKG waren keine pathologischen Veränderungen nachweisbar.

Die Tochter der Indexpatientin hat einen BMI von 19,1 und bis auf die positive Familienanamnese ebenfalls keine weiteren kardiovaskulären Risikofaktoren. Im EKG fanden sich keine auffälligen Veränderungen. Sie ist gesund, hat keine Erkrankungen.

Bei Sohn 2 liegen eine Hyperlipoproteinämie und ein Nikotinabusus vor. Sein BMI beträgt 26,2, was einer Präadipositas entspricht. Im 24h-EKG waren vereinzelte ventrikuläre Extrasystolen zu erkennen.

	Alter	IVS	LVEDD	LVESD	LVW	RV	LA-max.	Aortenwurzel	FS
Sohn 1	19 a	10 mm	42 mm	27 mm	9 mm				
Tochter	24 a	9 mm	45 mm	29 mm	9 mm	n	37 mm	23 mm	36%
Tochter	28 a	11 mm	44 mm	29 mm		30 mm	42 mm	25 mm	35%
Sohn 2	26 a	11 mm	54 mm	36 mm	11 mm	n	35 mm	24 mm	33%
Sohn 2	31 a	9 mm	50 mm	33 mm		30 mm	40 mm	25 mm	33%

**Tab. 3.9:** Echokardiografische Daten der Kinder der Indexpatientin

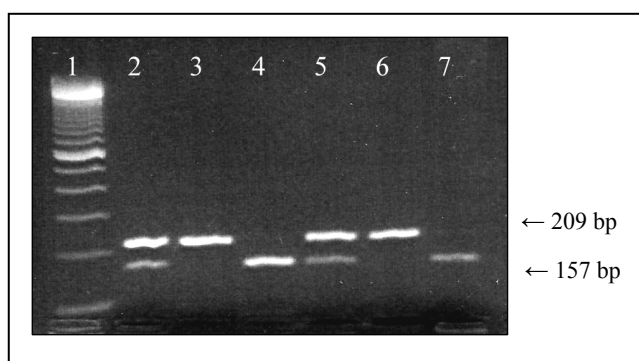
Der im DHZB untersuchte Bruder der Indexpatientin ist klinisch gesund, apparativ-diagnostisch fand sich eine bisher unbekannte Myokardhypertrophie mit einer Septumdicke von 18mm. Dies könnte auf eine beginnende HCM hinweisen.

Alter	IVS	LVEDD	LVESD	RVEDD	LA max.	Aortenwurzel	FS
38 a	18 mm	46 mm	33 mm	35 mm	40 mm	23 mm	29 %

**Tab. 3.10:** Echokardiografische Daten des Bruders der Indexpatientin

### 3.3.1.3 Untersuchung der Familie der Indexpatientin mittels Restriktionsverdau

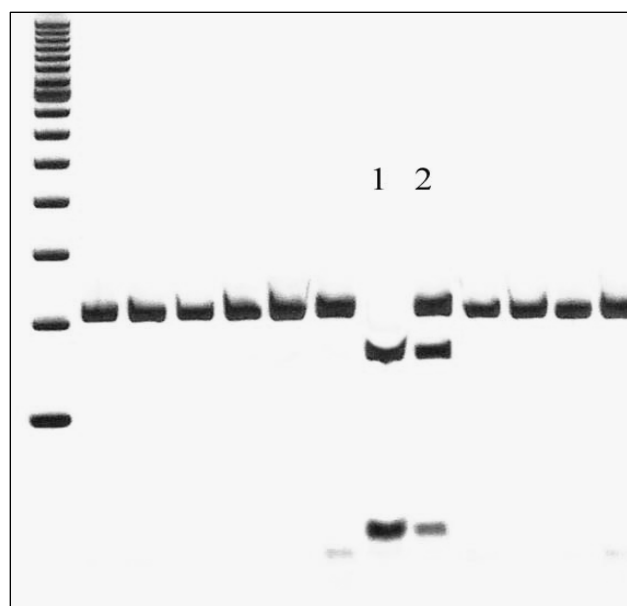
Mittels des unter 3.2.2.1 beschriebenen Nachweisverfahrens unter Verwendung des Restriktionsenzym *Rsa* I wurde die Familie der betroffenen Probandin untersucht. Es ergab sich folgendes Bild:



**Abb. 3.10:** Restriktionsverdau Exon 1 mit *Rsa* I, in den einzelnen Spuren zu sehen von links nach rechts Marker (100bp)-1, Indexpatientin-2, ihr Ehemann-3, Sohn(2)-4, Tochter-5, Sohn(1)-6, Bruder-7. Die Bande bei 52 bp ist aufgrund ihrer Kürze aus dem Gel herausgelaufen und demzufolge im Bild nicht zu erkennen.

Daraus ist ersichtlich, dass sowohl ein Sohn (Sohn 2) als auch die Tochter der Probandin die Mutation von ihrer Mutter geerbt haben. Der Bruder der Indexpatientin ist ebenfalls Träger der Mutation. Die Indexpatientin und ihre Tochter sind heterozygot für die Mutation, Bruder und Sohn (Sohn 2) hemizygot. Der Ehepartner der Indexpatientin und ein Sohn (Sohn 1) weisen an dieser Stelle keine Mutation im Melusin auf.

Zur Kontrolle, ob die gefundene Veränderung häufig in der gesunden Normalbevölkerung auftritt, wurde der oben beschriebene Restriktionsverdau für eine Kontrollgruppe, die aus unbekanntem Blutspendern rekrutiert wurde, durchgeführt. Bei insgesamt 190 untersuchten Kontrollen fand sich die Mutation nicht. Die Auftrennung der Fragmente erfolgte mithilfe der elektrophoretischen Auftrennung im Polyacrylamidgel bei 120 V über 120 min.



**Abb. 3.11:** Restriktionsverdau Exon 1 mit *Rsa* I, Ausschnitt aus Kontrollgruppe mit Sohn(2) in Spur 1 und Indexpatientin in Spur 2, es wurde ein 100 bp Marker verwendet

### 3.3.1.4 Troponin T

Die DNA der Indexpatientin wurde in unserer Arbeitsgruppe schon früher im Rahmen anderer Mutationsstudien untersucht. Dabei war eine Mutation im Troponin T -Gen der Indexpatientin gefunden worden. Diese hat sie an einen ihrer beiden Söhne (Sohn 2) vererbt.

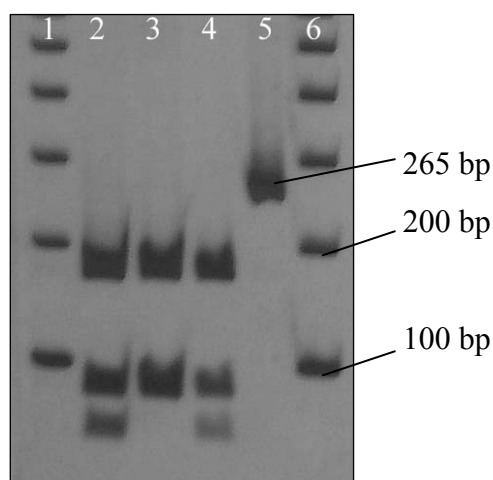
Aufgrund dieser Informationen war es notwendig, die bekannten weiteren Familienmitglieder auf Vorliegen der Mutation im Troponin T zu untersuchen. So konnte eine Infragestellung der möglichen Relevanz der Mutation im Exon 1 des Melusins durch gleichzeitiges Vorliegen der Variante im Troponin T -Gen ausgeschlossen werden. Dies geschah mittels eines schon etablierten Restriktionsverdau (Praktikumsarbeit T. Haase) mit dem Restriktionsenzym *HpyCH4V*, welches spezifisch an der Stelle 5'-TG/CA-3' schneidet. Die zu untersuchende Mutation befindet sich in der 265 bp großen 3'-untranslatierten Region (3'UTR) des Troponin T -Gens. Bei Vorliegen eines Wildtyp-Allels schneidet das Enzym einmal nach Nukleotid 88, das heißt, man erhält zwei Fragmente von 88 beziehungsweise 177 bp Länge. Bei Vorhandensein der zu untersuchenden Mutation ergibt sich bei 70 bp eine weitere Schnittstelle; bei für die Mutation heterozygoter DNA ergeben sich dadurch Fragmente von 177, 88, 70 und 18 bp Länge. Eine homozygote Mutation ließe 177, 70 und 18 bp große Fragmente erwarten. Mittels Polyacrylamidgel-Elektrophorese bei 120 V über einen Zeitraum von 120 Minuten können die durch den Restriktionsverdau entstandenen Fragmente aufgetrennt werden. Eine Übersicht gibt Tabelle 3.11.

Wildtyp	Mutation heterozygot	Mutation homozygot
88 bp	88 bp	
177 bp	177 bp	177 bp
	70 bp	70 bp
	18 bp	18 bp

**Tab. 3.11:** Fragmentgrößen 3'-UTR Troponin T nach Restriktionsverdau mit *HpyCH4V*



Folgendes Bild zeigt das Ergebnis bei Untersuchung des Bruders und der Tochter der Indexpatientin:

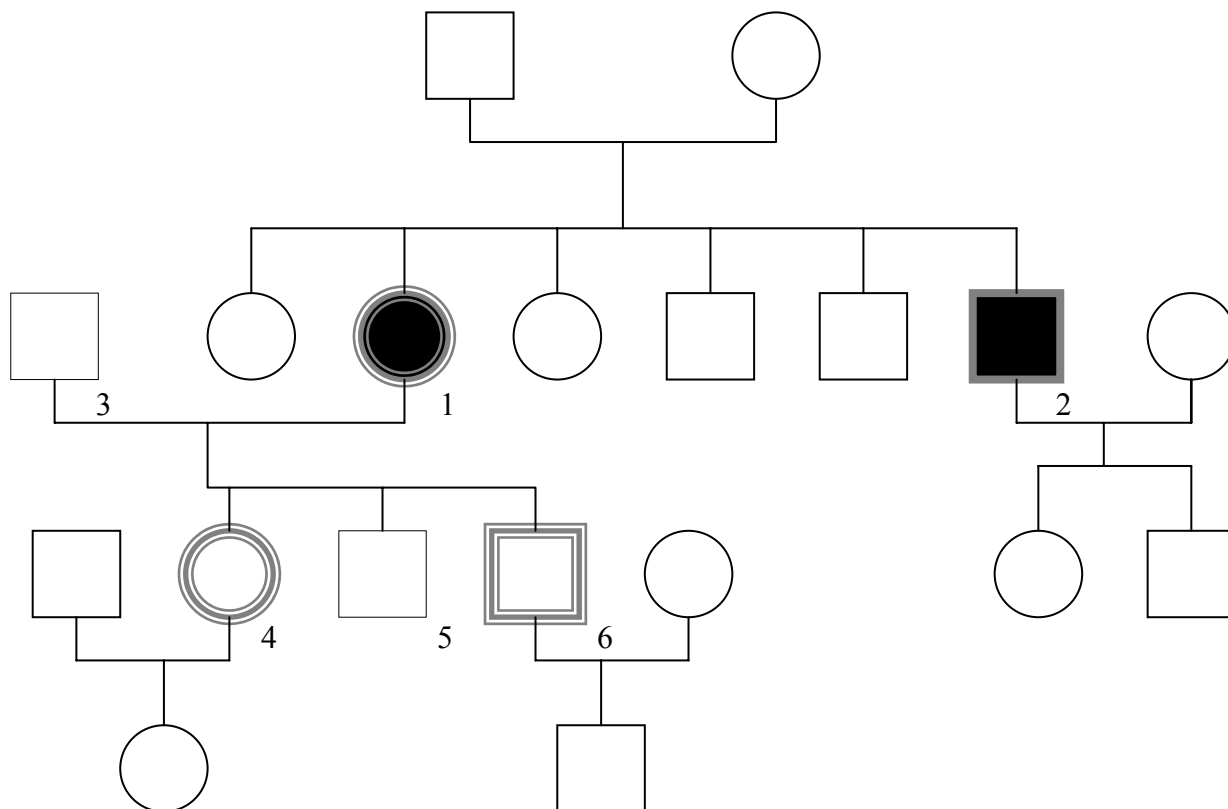


**Abb. 3.12:** Restriktionsverdau Amplifikat 3'-UTR Troponin T mit *HpyCH4V*, in Spur 1 und 6 ist jeweils ein Marker (100 bp) zu sehen, Spur 2 Tochter, Spur 3 Bruder, Spur 4 Indexpatientin, Spur 5 unverdautes Kontrollamplifikat

Der Bruder der Indexpatientin hat demzufolge diese Mutation nicht; die Tochter ist Mutations-trägerin. Die 18 bp großen Fragmente können im Bild aufgrund ihrer Kürze und damit sehr schnellen Laufverhaltens nicht sichtbar gemacht werden.

Im Bild nicht zu sehen ist das Ergebnis für den Ehemann der Patientin, welcher nicht Mutations-träger ist.

### 3.3.1.5 Stammbaum der Familie der Indexpatientin



- Melusin - Mutation
- ≡≡≡ Melusin - Mutation und Troponin T - Mutation
- ■ Erkrankt

1	Indexpatientin	(53 a)	4	Tochter von 1 und 3	(28 a)
2	Bruder von 1	(38 a)	5	Sohn (1) von 1 und 3	(19 a)
3	Ehemann von 1	(58 a)	6	Sohn (2) von 1 und 3	(31a)

### 3.3.1.6 Homologien Exon 1

Zur weiteren Analyse der gefundenen Mutation im Exon 1 des Melusin wurde die Aminosäuresequenz in verschiedenen Spezies mithilfe der Datenbank (NCBI) ermittelt und diese untereinander auf Homologie untersucht.

MSLLCRNKGCGQ <b>H</b> FDPTNLP	Melusin	<i>Homo sapiens</i>	NP_036410.1
MSLLCYNKGCGQ <b>H</b> FDPTNLP	Melusin	<i>Mus musculus</i>	NP_038740.1
MSLLCYNKGCGQ <b>H</b> FDPTNLP	s. to Melusin	<i>Rattus norvegicus</i>	XP_228553.2
MALLCYNRGCGQ <b>R</b> FDPETN	chymotrypsin-like protein	<i>Homo sapiens</i>	AF123249_1
MALLCYNRGCGQ <b>R</b> FDPETN	CHORD domain-containing prot.1	<i>Homo sapiens</i>	NP_036256.1
MALLCYNRGCGQ <b>R</b> FDPEAN	CHORD- zinc-binding protein1	<i>Mus musculus</i>	NP_080120.2
MALLCYNRGCGQ <b>R</b> FDPEAN	s. to CHORD- zinc-binding prot.1	<i>Rattus norvegicus</i>	XP_235878.2
MALLCYNWGCGQ <b>R</b> FDPETD	s. to CHORD domain-containing prot.1	<i>Homo sapiens</i>	XP_301128.1
MSLMCYNKGCGQ <b>R</b> FDLEKN	unbekannt	<i>Danio rerio</i>	AAH53137.1

**Abb. 3.13:** Alignment Exon 1, dargestellt ist die Aminosäuresequenz von Melusin und verwandten Proteinen aus verschiedenen Spezies, dahinter jeweils die Accessionnummer (NCBI)

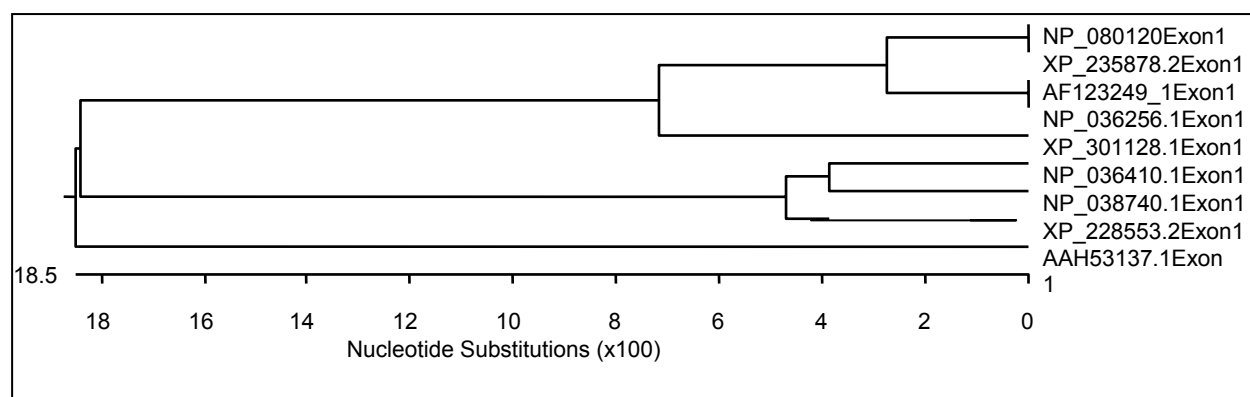
Es ist zu erkennen, dass die fragliche Aminosäure in den drei als Melusin bezeichneten Genprodukten von Mensch (*Homo sapiens*), Maus (*Mus musculus*) und Ratte (*Rattus norvegicus*) zu 100 % konserviert ist. In den nah verwandten Genprodukten unterschiedlicher Spezies ist an dieser Stelle ein Arginin hoch konserviert. Im durch die oben beschriebene Mutation im Exon 1 des Melusin veränderten Genprodukt findet sich an entsprechender Position ein Tyrosin.

Um einen Überblick über die genetische Konservierung des vom Exon 1 des Melusins kodierenden DNA-Bereiches zu bekommen, wurde mithilfe des Programmes DNASTAR MegAlign eine Tabelle der Identität bzw. Divergenz, jeweils in Prozent angegeben, erstellt.

PERCENT IDENTITY										
D		1	2	3	4	5	6	7	8	9
I	1		73,7	73,7	68,4	73,7	73,7	73,7	73,7	68,4
V	2	32,4		100	73,7	78,9	94,7	78,9	94,7	89,5
E	3	32,4	0,0		73,7	78,9	94,7	78,9	94,7	89,5
R	4	40,9	32,4	32,4		95,2	68,4	95,2	68,4	68,4
G	5	32,4	24,8	24,8	4,9		73,7	100	73,7	73,7
E	6	32,4	5,5	5,5	40,9	32,4		73,7	100	84,2
N	7	32,4	24,8	24,8	4,9	0,0	32,4		73,7	73,7
C	8	32,4	5,5	5,5	40,9	32,4	0,0	32,4		84,2
E	9	40,9	11,4	11,4	40,9	32,4	17,8	32,4	17,8	

**Abb. 3.14:** Genetische Konservierung des Exon 1 des Melusin, angegeben ist jeweils die Accession-number (NCBI) **1** AAH53137.1 Exon1, **2** AF123249\_1 Exon1, **3** NP\_036256.1 Exon1, **4** NP\_036410.1 Exon1, **5** NP\_038740.1 Exon1, **6** NP\_080120.2 Exon1, **7** XP\_228553.2 Exon1, **8** XP\_235878.2 Exon1, **9** XP\_301128.1 Exon1

Der mithilfe des Programmes DNASTAR MegAlign erstellte phylogenetische Baum verdeutlicht dies graphisch.



**Abb. 3.15:** Phylogenetischer Baum des Exon 1 des Melusins, angegeben ist jeweils die Accession-number (NCBI) der jeweiligen Spezies

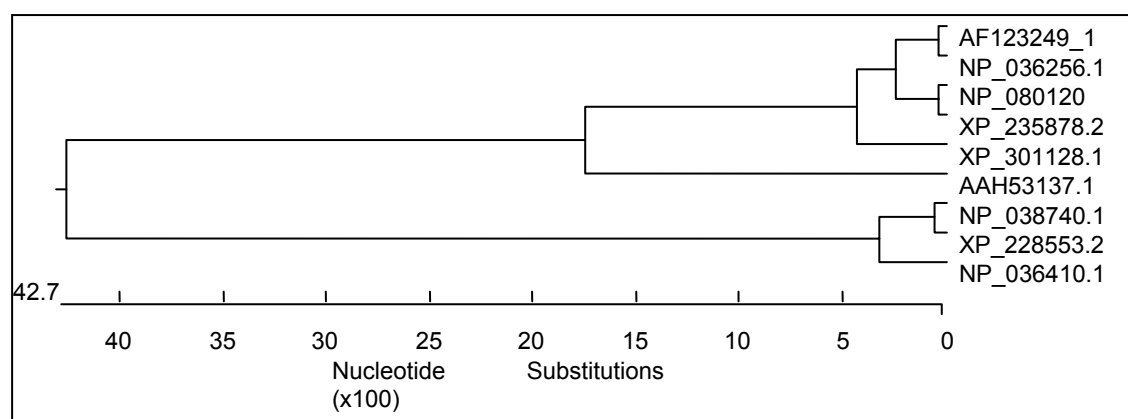
Die gefundene Mutation liegt also in einer genetisch hoch konservierten Region, folglich kann man eine wichtige Funktion dieses Sequenzabschnittes vermuten. Andernfalls wäre eine höhere Variabilität zu erwarten. Eine Mutation in diesem Bereich kann also zu wesentlich veränderten Eigenschaften des gesamten Genproduktes führen.

Für den gesamten vom Melusin kodierten Bereich wurde die gleiche Untersuchung durchgeführt.

PERCENT IDENTITY										
D		1	2	3	4	5	6	7	8	9
I	1		69,3	70,2	42,5	41,9	71,6	44,0	71,6	68,8
V	2	36,0		99,4	43,5	44,4	94,9	44,4	94,9	76,4
E	3	34,9	0,3		44,6	45,2	94,9	45,8	94,9	88,9
R	4	91,6	81,7	80,3		89,6	44,1	91,9	44,1	43,1
G	5	91,1	80,3	79,0	6,7		45,0	98,9	44,7	43,1
E	6	33,1	4,6	5,0	81,6	80,3		45,6	99,4	88,9
N	7	89,8	79,9	78,6	6,3	1,2	79,9		45,6	43,1
C	8	33,1	4,6	5,0	81,6	80,3	0,6	79,9		91,7
E	9	37,6	8,5	8,1	78,9	75,0	8,9	74,1	8,9	

**Abb. 3.16:** Genetische Konservierung des Melusin, angegeben ist jeweils die Accessionnummer (NCBI) **1** AAH53137.1, **2** AF123249\_1, **3** NP\_036256.1, **4** NP\_036410.1, **5** NP\_038740.1, **6** NP\_080120.2, **7** XP\_228553.2, **8** XP\_235878.2, **9** XP\_301128.1

Auch hier zur graphischen Verdeutlichung ein phylogenetischer Baum.



**Abb. 3.17:** Phylogenetischer Baum des Melusins, angegeben ist jeweils die Accessionnummer (NCBI) der jeweiligen Spezies

Vergleicht man die Abbildungen 3.14 und 3.16 bzw. 3.15 und 3.16 erkennt man, dass das Exon 1 höher konserviert ist, als das Gesamtprotein. Dies ist ein weiterer Anhaltspunkt für die Vermutung, dass das Exon 1 für die Funktion des Melusin eine wesentliche Rolle spielt. Dies unterstreicht die These, dass die gefundene Mutation im Exon 1 wichtige Bedeutung besitzen könnte.

### **3.3.2 Mutation Exon 6**

Da die gefundene Mutation in einem Intron außerhalb der Spleißstellen liegt, wurde auf weitergehende Untersuchungen in diesem Fall verzichtet.