

IDENTIFIZIERUNG GENETISCHER DEFEKTE
DER FAMILIÄREN DILATATIVEN KARDIOMYOPATHIE



Dissertation zur Erlangung des
naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Leif Heinrich Kühler

Geboren am 14.12.1977 in Esslingen am Neckar

Würzburg, März 2007

**IDENTIFIZIERUNG GENETISCHER DEFEKTE
DER FAMILIÄREN DILATATIVEN KARDIOMYOPATHIE**

Dissertation zur Erlangung des
naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Leif Heinrich Kühler

Geboren am 14.12.1977 in Esslingen am Neckar

Würzburg, März 2007

Eingereicht am: _____

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender: _____

Gutachter: _____

Gutachter: _____

Tag des Promotionskolloquiums: _____

Doktorurkunde ausgehändigt am: _____

1	ABSTRACT	1
1.1	ENGLISH	1
1.2	DEUTSCH	2
2	EINFÜHRUNG	5
2.1	DILATATIVE KARDIOMYOPATHIE (DCM)	5
2.2	MITOCHONDRIEN	12
2.2.1	MITOCHONDRIOPATHIEN	14
2.3	DIHYDROLIPOAMID-DEHYDROGENASE (DLD)	16
2.4	A-TYP LAMINE	19
2.5	KOPPLUNGSANALYSE	22
2.6	NONSENSE-MEDIATED mRNA DECAY (NMD)	24
3	METHODEN	26
3.1	MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN	26
3.1.1	DNA-ISOLATION	26
3.1.2	RNA-ISOLATION	26
3.1.3	KONZENTRATIONSBESTIMMUNG VON NUKLEINSÄURELÖSUNGEN	27
3.1.4	REVERSE TRANSKRIPTION	27
3.1.5	POLYMERASE-KETTENREAKTION (PCR)	28
3.1.6	<i>REAL-TIME</i> -PCR	29
3.1.7	AGAROSE-GELELEKTROPHORESE	30
3.1.8	ISOLIERUNG VON DNA-FRAGMENTEN AUS AGAROSEGELEN	30
3.1.9	DNA-SEQUENZIERUNG	31
3.1.10	MUTATIONSANALYSE VON KANDIDATENGENEN	32
3.1.11	RESTRIKTIONSVERDAU	32
3.1.12	DEPHOSPHORYLIERUNG DER 5`-ENDEN VON DNA	33
3.1.13	LIGATION VON DNA-FRAGMENTEN	33
3.1.14	HERSTELLUNG CHEMISCH KOMPETENTER BAKTERIEN	34
3.1.15	BAKTERIENTRANSFORMATION	34
3.1.16	PRÄPARATION VON PLASMID-DNA	35

3.2	KOPPLUNGSANALYSE (<i>LINKAGE ANALYSIS</i>)	36
3.2.1	MIKROSATELLITENMARKER	36
3.2.2	GENOTYPISIERUNG	36
3.2.3	LOD-SCORE BERECHNUNG	37
3.3	PROTEINBIOCHEMISCHE METHODEN	38
3.3.1	GESAMTZELLEXTRAKT	38
3.3.2	ISOLIERUNG VON MITOCHONDRIEN	39
3.3.3	PROTEINFÄLLUNG	40
3.3.4	KONZENTRATIONSBESTIMMUNG VON PROTEINLÖSUNGEN	40
3.3.5	SDS-POLYACRYLAMIDGELELEKTROPHORESE	40
3.3.6	WESTERN-BLOT-ANALYSE	41
3.3.7	BESTIMMUNG DER ENZYMAKTIVITÄT VON DIHYDROLIPOAMID-DEHYDROGENASE	43
3.3.8	BESTIMMUNG DER ENZYMAKTIVITÄT DER SUCCINAT-DEHYDROGENASE	43
3.3.9	<i>IN VITRO</i> TRANSKRIPTION UND TRANSLATION	44
3.3.10	<i>IN VITRO</i> PROTEINIMPORT IN MITOCHONDRIEN	44
3.4	ZELLKULTUR	45
3.4.1	ISOLATION VON LEUKOZYTEN AUS VOLLBLUT	45
3.4.2	ÜBERNACHTKULTUR PRIMÄRER LEUKOZYTEN	46
3.4.3	EBV-TRANSFORMATION VON LEUKOZYTEN	46
3.4.4	ZELLKULTUR EUKARYONTISCHER ZELLEN	47
3.4.5	ZELLEN EINFRIEREN UND AUFTAUEN	47
3.4.6	TRANSFEKTION EUKARYONTISCHER ZELLEN	47
3.4.7	FLUORESZENZMIKROSKOPIE	48
3.5	KRITERIEN ZUR DIAGNOSE VON FAMILIÄRER DCM	48
4	<u>ERGEBNISSE</u>	50
4.1	POSITIONELLE KLONIERUNG EINES DCM-GENS	50
4.1.1	PHÄNOTYPISCHE CHARAKTERISIERUNG DER FAMILIE DCM-I	50
4.1.2	KOPPLUNGSANALYSE	51
4.1.3	MUTATIONSANALYSE DER KANDIDATENGENE	59
4.1.4	FUNKTIONELLE UNTERSUCHUNG DER MUTATION T34A IM DLD	65
4.2	KANDIDATENGEN-ANALYSE	72
4.2.1	PHÄNOTYPISCHE CHARAKTERISIERUNG DER FAMILIE DCM-II	72
4.2.2	MUTATIONSSCREENING IM LAMIN A/C-GEN	73

5	DISKUSSION	80
5.1	POSITIONELLE KLONIERUNG EINES NEUEN DCM-GENS	80
5.2	KANDIDATENGEN-ANALYSE	88
6	LITERATURVERZEICHNIS	93
7	ANHANG	102
7.1	MATERIAL	102
7.1.1	CHEMIKALIEN UND VERBRAUCHSMATERIAL	102
7.1.2	ENZYME	104
7.1.3	ANTIKÖRPER	104
7.1.4	GERÄTE	104
7.2	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	105
7.3	INTERNETVERZEICHNIS	108
7.4	PUBLIKATIONSVERZEICHNIS	109
7.4.1	ORIGINALARBEITEN	109
7.4.2	POSTER	109
	LEBENS LAUF	110
	DANKSAGUNG	112

1 Abstract

1.1 English

Heart failure is of growing medical and economic importance. Dilated cardiomyopathy (DCM) is a significant cause of heart failure, often leading to cardiac transplantation. 20-30 % of DCM cases are familial. Using genetic strategies mutations in genes encoding various cytoskeletal proteins have been identified. These findings led to the hypothesis, that DCM is a disease caused by an impairment of force transduction from the sarcomere to the sarcolemma. Additionally, a reduced production of force caused by mutations in sarcomeric proteins could lead to DCM. On the other hand mutations in lamin A/C and G4.5 do not exactly fit into this model. To understand the entire complexity of genetic defects leading to DCM, it is important to identify further DCM genes.

In the first project a four generation pedigree (DCM-I) including 16 affected family members with autosomal dominant inheritance of dilated cardiomyopathy has been investigated. After exclusion of already known DCM loci, a whole genome screen was performed, using the *Weber 10.0 screening set*. The linkage analysis allowed an exclusion of linkage for 80 % of the human genome whereas several adjacent markers on the long arm of chromosome 7 showed co-segregation between marker alleles and disease. A maximal Lod-score of 4.20 was obtained at D7S471 and D7S501. Fine mapping with additional markers defined a candidate region spanning 9.73 Mb between markers D7S2545 and D7S2554. The minimal candidate region contains 32 known genes and 6 predicted transcripts – non of them coding for a cytoskeletal or sarcomeric protein. Mutation screening identified an A to G transition at nucleotide position 100 (A100G) in exon 2 of the gene DLD that codes for a mitochondrial protein named dihydrolipoamide dehydrogenase. The mutation changed the second last amino acid of the leader peptide which is essential for mitochondrial import. We hypothesized that either the transport reaction or the processing might be affected. Therefore we cloned the leader peptide of DLD N-terminal to GFP and examined the localisation of the fusion protein in transfected mammalian cells and in isolated mitochondria. These results showed that the fusion protein with the mutated leader peptide has been transported to the mitochondria in the same way as the fusion protein with the wildtype leader peptide. There were also no differences concerning the cleavage of the leader peptide after import. The enzyme activity of the dihydrolipoamide dehydrogenase in lymphocytes carrying the mutation A100G is not reduced compared to the enzyme activity in normal lymphocytes.

The identification of DLD as a novel DCM causing gene which is involved in the energy metabolism of the cell provides a new and important piece of information, which will help to understand the complex pathophysiology of dilated cardiomyopathy and heart failure.

In the second project we investigated a four generation pedigree of a German family with varying degrees of early atrial fibrillation, subsequent stroke, AV-Block, cardiomyopathy and limb girdle muscular dystrophy. Familial dilated cardiomyopathy associated with conduction disturbances and variable degrees of myopathies has been correlated with mutations in the gene coding for the A-type lamins (LMNA). In addition, mutations in LMNA have been shown to cause Emery-Dreifuss-muscular dystrophy, Limb-girdle muscular dystrophy type 1B, partial lipodystrophy type 2, mandibuloacral dysplasia type A with partial lipodystrophy, Charcot-Marie-Tooth type 2B1 and Hutchinson-Gilford progeria syndrome. Because more than 90 % of the mutations in LMNA represent missense mutations it has been proposed that the disease causing mechanism would primarily be a dominant negative effect of the mutated “poison polypeptides” that disrupt the three dimensional structure of the filaments.

Molecular analysis of the coding sequence of LMNA identified a C to T transition at nucleotide position 700 (C700T) in exon 4 which co-segregates with the phenotype in an autosomal-dominant pattern. The mutation introduces a stop codon at amino acid position 234 (Q234X). RT-PCR of lymphocyte RNA from affected individuals failed to detect the transcript from the mutant allele but not from the wildtype allele indicating that the mutated transcript is subjected to nonsense-mediated decay (NMD). Inhibition of NMD by treatment of patient lymphocytes with both cycloheximide and emetine stabilized the message from the mutated allele. Quantification of the lamin transcripts in fibroblasts by using a Real-Time-PCR approach showed a marked decrease of the transcripts in cells from affected family members. In addition, we demonstrated a reduced expression of lamin A and lamin C by Western Blot analysis.

These results demonstrate that the transcript carrying the premature stop codon is degraded by nonsense-mediated mRNA decay, and that DCM in this family is caused by haploinsufficiency of lamin A and lamin C.

1.2 Deutsch

Herzinsuffizienz ist eine Krankheit mit wachsender medizinischer und ökonomischer Bedeutung. Die dilatative Kardiomyopathie (DCM) ist eine der Hauptursachen für Herzversagen und führt in den meisten Fällen zu einer Herztransplantation. 20-30 % der DCM-Erkrankungen haben einen genetischen Hintergrund. Durch die Anwendung molekulargenetischer Methoden konnte bereits eine Reihe DCM-verursachender Gene identifiziert werden. Mutationen in Zytoskelettproteinen führten zu der Hypothese, dass eine Beeinträchtigung der Kraftübertragung vom Sarkomer auf be-

nachbarte Myozyten eine Ursache für die DCM sein könnte. Zusätzlich scheint auch eine reduzierte Kraftentwicklung, ausgelöst durch Mutationen in den Proteinen des Sarkomers die Entwicklung der DCM zu begünstigen. Darüber hinaus wurden Mutationen in Proteinen gefunden, wie z.B. im Lamin A/C- oder Tafazzin-Gen, deren Rolle in der Pathophysiologie der DCM noch nicht geklärt sind. Um die Komplexität der genetischen Defekte, die eine DCM verursachen, besser zu verstehen, ist es notwendig weitere krankheitsverursachende Gene zu identifizieren.

Im ersten Projekt untersuchten wir eine Familie (DCM-I) mit 16 an DCM erkrankten Familienmitgliedern. Der Phänotyp folgte einem autosomal-dominanten Erbgang. Nach Ausschluss aller bekannter DCM-Loci, führten wir eine genomweite genetische Suche mit den Mikrosatellitenmarkern der 10. Version des *Weber-Screeningsets* durch. Durch die Kopplungsanalyse war es möglich, genetische Kopplung für 80 % des Genoms auszuschließen. Mehrere benachbarte Marker auf dem langen Arm von Chromosom 7 zeigten hingegen Kosegregation mit dem Krankheitsstatus. Ein maximaler LOD-Score von 4,20 wurde für die Marker D7S471 und D7S501 erzielt. Die Feinkartierung mit zusätzlichen Markern identifizierte eine Kandidatenregion, die von den beiden Markern D7S2545 und D7S2554 begrenzt wird und ein Intervall von 9,73 Mb umschließt. In dem minimalen Intervall sind 32 Gene sowie 6 aufgrund von Sequenzvergleichen vorhergesagte Transkripte kodiert. Keines dieser Gene kodiert für ein Zytoskelett- oder Sarkomerprotein. Durch Sequenzanalyse konnten wir eine neue DCM-verursachende Mutation (A100G) in Exon 2 des Gens DLD identifizieren, das für das mitochondriale Protein Dihydrolipoamid-Dehydrogenase (E3) kodiert. Die Mutation veränderte die vorletzte Aminosäure des Signalpeptids, das den Import des Proteins in die Mitochondrien dirigiert. Daher hatten wir die Hypothese, dass möglicherweise der Transport oder die Prozessierung des Signalpeptids beeinträchtigt sein könnte. Dazu haben wir das DLD-Signalpeptid mit GFP markiert und die Verteilung des Fusionsproteins in transfizierten humanen Zellen und in isolierten Mitochondrien untersucht. Die Resultate zeigten, dass die Fusionsproteine mit dem mutierten Signalpeptid genauso in die Mitochondrien transportiert und prozessiert wurden, wie die Fusionsproteine mit dem Wildtyp-Signalpeptid. Die Enzymaktivität der Dihydrolipoamid-Dehydrogenase in Lymphozyten mit der Mutation A100G liegt innerhalb der normalen Bandbreite und ist im Vergleich zu der Enzymaktivität in Kontroll-Lymphozyten nicht reduziert.

Die Identifikation von DLD, einem Protein des Energiemetabolismus, als neues DCM-verursachendes Gen in Familie DCM-I, kann zu einem besseren Verständnis der komplexen Pathophysiologie der dilatativen Kardiomyopathie beitragen.

Im zweiten Projekt haben wir eine Familie (DCM-II) untersucht, in der die erkrankten Familienmitglieder eines oder mehrerer der folgende Symptome aufwiesen: Reizleitungsstörungen, Schlaganfall, dilatative Kardiomyopathie, Gliedergürtel-Muskeldystrophie. Dilatative Kardiomyopathie

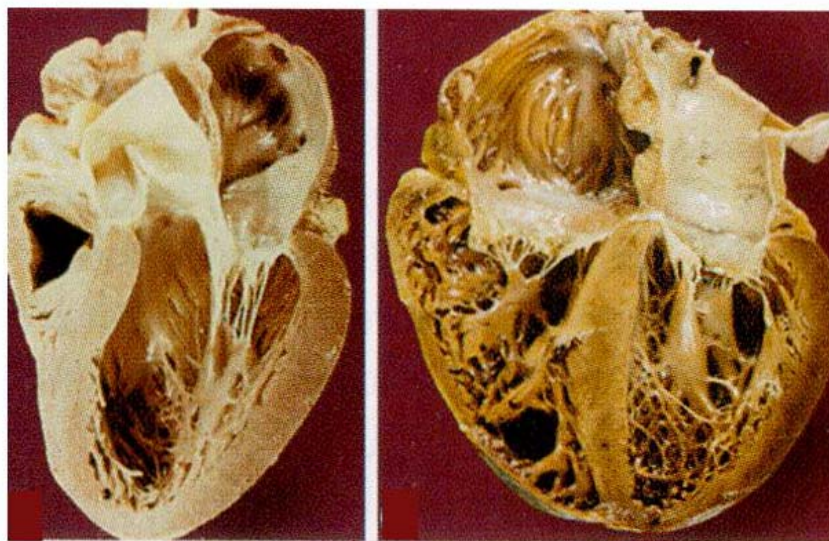
assoziiert mit Reizleitungsstörungen und Skelettmypathie ist mit Mutationen im Gen für Lamin A und Lamin C (LMNA) korreliert. Zusätzlich wurden Mutationen im LMNA in Zusammenhang mit der Emery-Dreifuss-Muskeldystrophie, der Gliedergürtel-Muskeldystrophie, Lipodystrophie, dem Charcot-Marie-Tooth-Syndrom und der Hutchinson-Gilford Progerie beschrieben. Da über 90 % der LMNA-Mutationen Missense-Mutationen sind, resultierte daraus die Hypothese, dass die mutierten Proteine über einen dominant-negativen Effekt die dreidimensionale Struktur der Lamin-Intermediärfilamente zerstören.

Durch Sequenzanalyse der proteinkodierenden Exons des LMNA konnten wir einen Basenpaar Austausch von C nach T an Position 700 (C700T) in Exon 4 identifizieren, der mit dem Phänotyp in der Familie segregierte. Die Mutation führte zum Einbau eines vorzeitigen Stop-Codons (PTC) an Position 234 (Q234X) der Aminosäuresequenz. Bei der Sequenzanalyse der Lamintranskripte aus Lymphozyten von erkrankten Individuen konnten wir nur das Wildtyp-Allel detektieren, aber nicht das mutierte Allel, was darauf schließen ließ, dass das mutierte Allel möglicherweise durch einen Kontrollmechanismus (*nonsense-mediated mRNA decay*, NMD) degradiert wurde. Nach Inhibition des NMD durch Inkubation der Lymphozyten mit Cycloheximid oder Emetin, akkumulierte das mutierte Transkript wieder in der Zelle. Die Quantifizierung der Lamintranskripte durch Amplifikation mittels *Real-Time*-PCR zeigte eine deutliche Reduktion der Menge an Transkripten in Fibroblasten von erkrankten Familienmitgliedern. Die Western-Blot-Analyse konnte eine reduzierte Expression von Lamin A und Lamin C bestätigen. Die Ergebnisse zeigen, dass das Transkript mit dem PTC durch die NMD-Maschinerie degradiert wird und eine Haploinsuffizienz von Lamin A und Lamin C die DCM in dieser Familie verursacht.

2 Einführung

2.1 Dilatative Kardiomyopathie (DCM)

In den westlichen Industriestaaten zählen Kardiomyopathien zu den größten Gesundheitsproblemen unserer Zeit. Schätzungen zur Folge liegt die Prävalenz der Herzinsuffizienz in europäischen Ländern zwischen 0,4 % und 2 % und nimmt mit höherem Alter stetig zu [Remme and Swedberg 2001]. Bei Menschen über 65 Jahren liegt die Prävalenz bereits bei bis zu 10 %. Durch die hohen Gesundheitskosten, die sie verursacht, stellt die Herzinsuffizienz auch eine große ökonomische Belastung dar. In den USA werden jährlich über 5 % des gesamten Gesundheitsetats für die Behandlung von Herzkrankheiten aufgewendet [Hunt et al. 2002]. Die Prognose für Menschen mit Herzinsuffizienz ist immer noch schlecht, da ungefähr die Hälfte aller Patienten innerhalb der ersten vier Jahre versterben [Remme and Swedberg 2001]. Die Herzinsuffizienz kann viele pathophysiologische Ursachen haben; zu den häufigsten zählen Erkrankungen der Herzkranzgefäße, Atherosklerose, Kardiomyopathien, Herzklappenfehler oder erblich bedingte Fehlbildungen.



normales Herz

dilatiertes Herz

Abbildung 2.1: Krankhafte Veränderungen bei einer dilatativen Kardiomyopathie (rechts). Zu erkennen sind die vergrößerten Ventrikel bei gleichzeitiger Abnahme der Wanddicke. [Abbildung entnommen aus *“The Genetic Basis for Cardiomyopathy: from mutation identification to mechanistic paradigms”*, J.G. Seidman, C.Seidman.]

Die dilatative Kardiomyopathie (DCM) ist mit einem Anteil von bis zu 30 % eine der Hauptformen der Herzinsuffizienz [Cowie et al. 1997]. Studien in den USA ergaben, dass die Prävalenz der DCM bei 36/100.000 Personen liegt [Codd et al. 1989]. Die DCM ist charakterisiert durch eine Reduzierung der Wanddicke (Abbildung 2.1), eine erheblicher Erweiterung des linken oder beider

Ventrikel (Dilatation) und eine Reduktion der linksventrikulären Pumpleistung (verminderte Ejektionsfraktion). Die Histopathologie der dilatativen Kardiomyopathie ist nicht spezifisch; es finden sich hypertrophe Kardiomyozyten sowie eine intertestinelle Fibrose und oft kommt es zu einem massiven Myozytenverlust. Häufig sind auch Ansammlungen inflammatorischer Zellen wie Makrophagen und T-Lymphozyten zu beobachten.

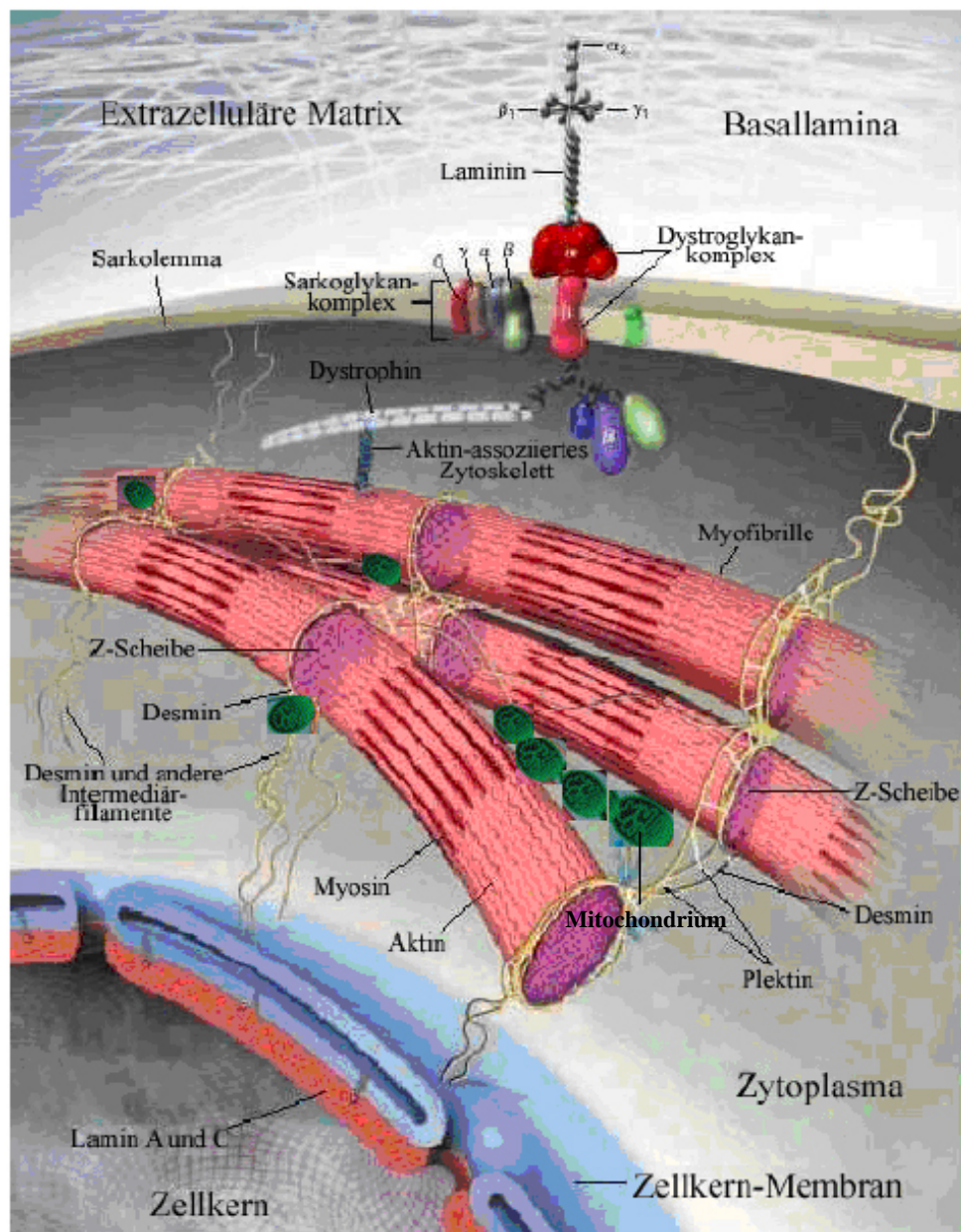


Abbildung 2.2: Übersicht der Proteine, in denen DCM-verursachende Mutationen identifiziert wurden. Die funktionelle Einheit der Herzmuskelzelle ist das Sarkomer, aufgebaut aus überlappenden Myosin- und Aktinfilamenten. Die Z-Scheiben sind von einem komplexen Netzwerk aus Zytoskelettproteinen (Desmin, Aktin und Mikrotubuli) umgeben, die die Sarkomere mit dem Sarkolemma und dem Nukleus verbinden. Die Kraftübertragung auf die extrazelluläre Matrix erfolgt u.a. über Fokalkontakte und Dystrophin-Glykoprotein-Komplexe, in denen die Zytoskelettproteine über Transmembranproteine mit Bestandteilen der extrazellulären Matrix, wie z.B. Kollagen und Laminin, interagieren. Die Mitochondrien sind zwischen den Myofibrillen lokalisiert, so dass eine räumliche Nähe zwischen dem Ort der ATP-Produktion und des ATP-Verbrauchs besteht. [Abbildung modifiziert nach “Desmin cytoskeleton: a potential regulator of muscle mitochondrial behavior and function”, Capetanaki 2002.]

Locus / Gen	Funktion	zusätzlicher Phänotyp	OMIM
Lamin A/C (LMNA)	Nukleus, Stabilität, Einfluss auf Genexpression	kardiale Reizleitungsstörungen	115200
kardiales Troponin T	Kontraktiler Apparat, Regulation der Kontraktion	keiner	191045
α -Actinin-2 (ACTN2)	Z-Scheibe, Organisation von Aktinfilamenten	Keiner	102573
2q14-22		kardiale Reizleitungsstörungen	604288
Titin (TTN)	Sarkomer, Stabilität und Elastizität	keiner	604145
Desmin (DES)	Zytoskelett; Kraftübertragung	Skelettmuskelschwäche	604765
3p23		ARVD	604400
3q22-25		kardiale Reizleitungsstörungen	601154
δ -Sarcoglycan (SGCD)	Dystrophin-assoziiertes Glykoproteinkomplex, Kraftübertragung	keiner	601411
Desmoplakin (DSP)	Desmosomen, Kraftübertragung und Integrität des Zellverbandes	Naxos-Syndrom	605676
6q12-16		keiner	605582
Phospholamban (PLN)	Ca^{2+} -Regulator, inhibiert SERCA	Keiner	172405
6q23		kardiale Reizleitungsstörungen, Skelettmuskelschwäche	602067
Eyes absent (EYA4)	Interagiert mit Transkriptionsfaktoren, Kardiomyozytenentwicklung	sensoneuraler Hörverlust	605362
9q13-22		keiner	600884
9q22-31		keiner	
10p12-14		ARVD	604401
Metavinculin (VCL)	Zytoskelett, Zell-Zell-Kontakte, Kraftübertragung	keiner	601493
Cypher/ZASP (LDB3)	Zytoskelett, Anordnung und Verteilung von Membranproteinen	Noncompaction	605906
Muscle LIM protein (MLP)	Z-Scheibe, Verankerung von Titin, Stretch-Sensor	Keiner	600824
ATP-sensitive K^+ -channel	Regulatorische Untereinheit des kardialen K_{ATP} -Kanals		601439
β -Myosin (MYH7)	Kontraktiler Apparat, Krafterzeugung	Keiner	160760
14q12-22		ARVD	602086
14q23-24		ARVD	107970
kardiales Aktin (ACTC)	Kontraktiler Apparat, Krafterzeugung	Keiner	602540
α -Tropomyosin (TPM1)	Kontraktiler Apparat, Regulation der Kontraktion	Keiner	191010
Cardiotrophin 1 (CTF1)	Zytokin, stimuliert Kardiomyozytenwachstum	Keiner	66435
Kardiales Troponin I (TNNI3)	Kontraktiler Apparat, Regulation der Kontraktion	Keiner	101044
Dystrophin (DMD)	Dystrophin-assoziiertes Glykoproteinkomplex, Kraftübertragung	keiner	302045
Taffazin (G4.5)	Mitochondriale Acyltransferase	Barth-Syndrom, endokardiale Fibroelastose	302060

Tabelle 2.1: Bekannte Gene und Loci für familiäre dilatative Kardiomyopathie. ARVD = arrhythmogene rechtsventrikuläre Dysplasie

Eine dilatative Kardiomyopathie kann sich als primäre Erkrankung manifestieren oder sekundär als Konsequenz anderer Erkrankungen, wie z.B. einer Entzündungen des Herzmuskels mit viralem (meistens Coxsackie B-Virus) Ursprung, einer Autoimmunerkrankung oder eines schlecht eingestellten Bluthochdruckes. Aber auch hohe körperliche Belastungen durch Umweltgifte, übermäßiger Alkoholgenuss oder Einwirkung anderer Toxine, wie z.B. einige Antikrebs-Medikamente, können zur Manifestation einer sekundären DCM führen. Unabhängig von diesen individuellen Risikofaktoren hat die primäre DCM genetische Ursachen. Statistische Auswertungen der Familien von DCM Patienten ergaben, dass 25-30 % aller DCM-Erkrankungen genetisch bedingt sind [Grünig et al. 1998]. Die Erbgänge der familiären DCM sind größtenteils autosomal dominant. Aber auch autosomal rezessive, X-chromosomal gekoppelte und maternale Erbgänge, verursacht durch Mutationen der mitochondrialen DNA, wurden beschrieben [Mestroni et al. 1999].

Bisher konnten DCM-verursachende Mutationen in Proteinen mit ganz unterschiedlichen Funktionen und Aufgaben in der Zelle identifiziert werden (Tabelle 2.1 und Abbildung 2.2). Die ersten DCM-verursachenden Mutationen wurden im Aktin-Gen identifiziert. Aktin ist ein Hauptbestandteil der dünnen Filamente im Sarkomer. Die Aktinfilamente sind in der Z-Scheibe verankert und ragen zu beiden Seiten in die Mitte des Sarkomers, wobei sie mit den Myosinfilamenten überlappen. Die Kontraktion wird durch Wechselwirkungen zwischen Aktin und Myosin ausgelöst. Die ersten im Aktin beschriebenen Missense-Mutationen betrafen konservierte Aminosäuren in einer Domäne des Proteins, die in die Bindung an die Z-Scheibe involviert ist. Die gestörte Interaktion des Aktins mit Proteinen der Z-Scheibe könnte möglicherweise die Übertragung der im Sarkomer erzeugten Kraft auf die benachbarten Myozyten und die extrazelluläre Matrix beeinträchtigen [Olson et al. 1998].

Weitere DCM-verursachende Mutationen in Sarkomerproteinen konnten u.a. in den Genen für Myosin, α -Tropomyosin und Troponin identifiziert werden. Die drei Troponin-Untereinheiten Troponin T (TnT), Troponin I (TnI) und Troponin C (TnC) bilden einen Komplex, der, zusammen mit Tropomyosin, die Ca^{2+} -abhängige Interaktion zwischen Aktin und Myosin reguliert. Bei steigenden Ca^{2+} -Konzentrationen führt die Bindung von Ca^{2+} -Ionen an TnC zu Konformationsänderungen im Troponinkomplex und im Tropomyosin, was Myosin-Aktin Interaktionen und damit eine Kontraktion des Sarkomers ermöglicht (Abbildung 2.3). Im Gen für Tropomyosin sind bisher nur drei DCM-assoziierte Mutationen bekannt, welche die elektrostatischen Wechselwirkungen zum Aktinmolekül beeinflussen [Olson et al. 2001] und eine Beeinträchtigung der Kraftentwicklung bewirken. Reduzierte Kraftentwicklung als Pathomechanismus wird auch für die DCM-verursachenden Mutationen in den Troponin-Untereinheiten diskutiert. Die Mutationen in den Troponin-Untereinheiten sind assoziiert mit einer verminderten Ca^{2+} -Sensitivität und einer Abnahme der ATPase-Aktivität im Myosinkopf [Chang and Potter 2005]. Mutationen im Myosin (MYH7)

wurden sowohl in der Kopf-, Hals- als auch in der Schwanzregion identifiziert [Kamisago et al. 2000] und vermindern möglicherweise die Effizienz der Krafterzeugung. Mutationen in der Kopfdomäne könnten die Interaktion mit Aktin oder die Hydrolyse von ATP beeinflussen, während Mutationen in den anderen Myosindomänen die Struktur und Ausrichtung der Myosinfilamente oder die Interaktion mit anderen Sarkomerproteinen (z.B. *Myosin-binding Protein C*) betreffen könnten [Chang and Potter 2005].

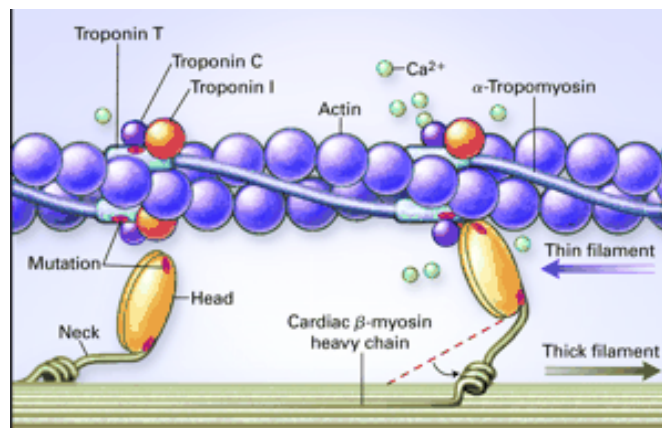


Abbildung 2.3: Krafterzeugung im Sarkomer. Die Bindung von Ca^{2+} -Ionen an den Troponin-Komplex löst im Tropomyosin eine Konformationsänderung aus, wodurch die Bindung der Myosinköpfchen an das Aktin ermöglicht wird. [Abbildung entnommen aus „Mutations in sarcomere protein genes as a cause of dilated cardiomyopathy“, Kamisago et al. 2001.]

Ein weiteres Protein, in dem DCM-assoziierte Mutationen identifiziert wurden, ist das Titin – ein riesiges Protein, das sich von der Z-Scheibe bis zur Mitte des Sarkomers erstreckt. Titin spielt eine wichtige Rolle bei der korrekten Anordnung der kontraktilen Proteine und der Aufrechterhaltung der Spannung und der Elastizität im Sarkomer. Durch seine Kinasedomänen ist Titin auch Teil zellulärer Signalwege. Mutationen im Titin, die die Verankerung in der Z-Scheibe schwächen oder trunkierte Titinmoleküle kodieren, könnten die Integrität der Sarkomere zerstören und die Anfälligkeit für mechanischen Stress erhöhen [Itoh-Satoh et al. 2002].

Die Z-Scheiben sind die seitlichen Begrenzungen der Sarkomere und nehmen eine zentrale Rolle bei vielen Funktionen der Herzmuskelzellen ein. In den Z-Scheiben sind die Filamente des kontraktilen Apparates – Aktin, Titin und Nebulin – verankert und miteinander verknüpft. Die Z-Scheiben benachbarter Myofibrillen sind untereinander und mit dem Sarkolemma über Desminfilamente verbunden (Abbildung 2.2). Somit wird die erzeugte Kraft von den Z-Scheiben auf die Muskelmembran übertragen [Clark et al. 2002]. Aufgrund ihrer Lage und Funktion wird diskutiert, ob Proteine der Z-Scheiben möglicherweise Teil der Signalwege sind, die die mechanische Belastung der Zelle wahrnehmen. Hinweise für eine Assoziation von Proteinen der Z-Scheibe mit DCM

wurden sowohl bei DCM-Patienten als auch in Tiermodellen gefunden. Mäuse, denen das muskelspezifische LIM Protein (MLP) fehlt, entwickeln eine dilatative Kardiomyopathie und Defekte in der Anordnung von Zytoskelett und Sarkomer werden deutlich [Arber et al. 1997]. Knöll et al. (2002) konnten zeigen, dass MLP wichtig ist für die Verankerung von Titin in der Z-Scheibe, und dass sich bei Kardiomyozyten von MLP defizienten Mäusen Defekte bei der Wahrnehmung von mechanischem Stress zeigen.

Nicht nur Mutationen in Proteinen des kontraktiven Apparates, sondern auch Proteine des Zytoskeletts spielen eine wichtige Rolle bei der Pathogenese der DCM. Mutationen wurden u.a. in den Genen für Desmin (DES), Metavinculin (VCL), und im Dystrophin-Glykoprotein-Komplex identifiziert (Abbildung 2.2). Desmin, ein muskelspezifisches Intermediärfilament, bildet ein dreidimensionales Netzwerk, das sowohl die Sarkomere mit Fokalkontakten, Spektrin-haltigen Strukturen und Dystrophin-Glykoprotein-Komplexen verbindet als auch die Plasmamembran mit der Kernmembran. Eine in der C-terminalen Domäne identifizierte Mutation verursacht eine Änderung der Sekundärstruktur, die möglicherweise eine Beeinträchtigung der Entwicklung und des Wachstums der Myozyten bewirkt oder aber die Kraftübertragung auf die extrazelluläre Matrix negativ beeinflusst [Li et al. 1999]. Metavinculin wird spezifisch in Herz- und Skelettmuskelzellen exprimiert und konnte in den Adhärenzpunkten der Glanzstreifen nachgewiesen werden. Bisher konnten drei DCM-assoziierte Mutationen im Metavinculin identifiziert werden. Für zwei dieser Mutationen wurde gezeigt, dass mutiertes Metavinculin *in vitro* die Aktinorganisation beeinflusst und *in vivo* die Ausbildung funktionsfähiger Glanzstreifen verhindert [Olson et al. 2002]. Der Dystrophin-Glykoprotein-Komplex, bestehend aus Zytoskelett-, Transmembran- und extrazellulären Proteinen, verbindet das intrazelluläre Zytoskelett-Netzwerk mit der extrazellulären Matrix. Mutationen im Dystrophin wurden zuerst bei Patienten mit Duchennscher Muskeldystrophie identifiziert [Koenig et al. 1987], später aber auch bei Patienten mit isolierter dilatativer Kardiomyopathie ohne Anzeichen einer Muskelschwäche [Towbin et al. 1993]. In diesen Fällen war entweder das 5'-Ende des Dystrophingens (DMD) durch Deletion des muskelspezifischen Promotors und eines Teils des ersten Exons betroffen oder die mittleren Proteindomänen, in denen Deletionen, Insertionen und Inversionen nachgewiesen wurden. Die Mutationen beeinträchtigen die Wechselwirkungen zwischen Dystrophin und den Glykoproteinkomplexen [Franz et al. 2000; Ortiz-Lopez et al. 1997].

Dass DCM nicht nur durch eine fehlerhafte Krafterzeugung im Sarkomer oder durch eine Beeinträchtigung der Kraftübertragung auf die extrazelluläre Matrix verursacht werden kann, wurde deutlich, nachdem DCM-assoziierte Mutationen in einer Reihe von Genen gefunden wurden, die in den Metabolismus der Zelle, in die Ca^{2+} -Homöostase oder in Signalwege und in der Transkriptionsregulation involviert sind. Eine DCM-verursachende Mutation konnte z.B. im Phospholamban (PLN) identifiziert werden, dem Inhibitor der sarkoplasmatischen Ca^{2+} -ATPase (SERCA2), die die

Kontraktilität des Herzens reguliert (Abbildung 2.4). Die Mutation verhindert die Phosphorylierung des PLN durch die Protein-Kinase A (PKA) nach einem β -adrenergen Stimulus. Dadurch kommt es zu einer verzögerten Wiederaufnahme der Ca^{2+} -Ionen aus dem Zytosol in das SR [Schmitt et al. 2003].

Der hohe ATP-Bedarf der Kardiomyozyten wird von den Mitochondrien gedeckt. Mutationen in mitochondrialen Proteinen, die den Energiehaushalt beeinträchtigen, sind daher mit einer Reihe von Multisystem-Krankheiten, einschließlich kardialer Abnormalitäten, assoziiert [Brega et al. 2001]. Dass auch die Regulation der Genexpression zur Pathogenese der DCM beitragen kann, zeigt eine Mutation im Gen für EYA4, die eine DCM und einen Hörverlust verursacht. EYA4 kodiert für einen transkriptionellen Koaktivator, der mit den Transkriptionsfaktoren Six und Dach interagiert. Zu den von der Eya-Familie regulierten Genen gehören u.a. solche, die bei der Muskelentwicklung eine essentielle Rolle spielen [Schönberger et al. 2005].

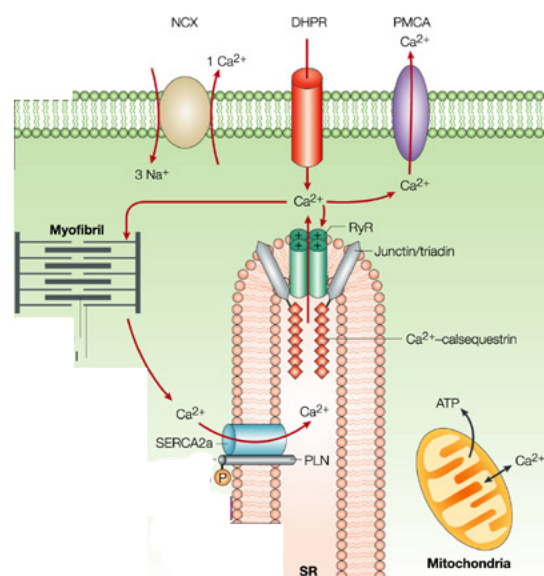


Abbildung 2.4: Ca^{2+} -Kreislauf in der Herzmuskelzelle. Ausgelöst durch eine Depolarisation strömt Ca^{2+} durch Kanäle in der Plasmamembran (DHPR) ins Zytosol. Die steigende intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration stimuliert die Ca^{2+} -Ausschüttung aus dem Sarkoplasmatischen Retikulum (SR) durch den Ryanodinrezeptor (RyR). Durch Bindung an Troponin C aktiviert Ca^{2+} die Muskelkontraktion. Anschließend wird das Ca^{2+} durch die Aktivität des $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauschers (NCX) und von Ca^{2+} -ATPasen (PMCA und SERCA2a) wieder aus dem Zytosol entfernt. [Abbildung entnommen aus "Phospholamban: a crucial regulator of cardiac contractility", MacLennan and Kranias, 2003.]

Aufgrund dieser Vielzahl an Mutationen und den noch fehlenden geeigneten Tiermodellen werden momentan zwei Hypothesen diskutiert, wie die morphologischen Veränderungen des Herzens induziert werden, die zur Manifestation einer DCM führen. Nach der ersten Hypothese ist die DCM das Resultat eines einzigen Pathomechanismus, der von den meisten Mutationen und Faktoren

schlussendlich aktiviert wird. In dem alternativen Modell führen mehrere voneinander unabhängige Signalwege zum gleichen Phänotyp der DCM [Ahmad et al. 2005].

2.2 Mitochondrien

Mitochondrien sind zytoplasmatische Organellen, deren Hauptaufgabe die Versorgung der Zelle mit ATP ist, dem universellen Energieträger der Zelle. Die Anzahl der Mitochondrien pro Zelle ist proportional zum Energiebedarf der Zelle. In Zellen mit einem hohen Energiebedarf (Muskelzellen, Nervenzellen, Sinneszellen) nehmen Mitochondrien teilweise bis zu 25 % des Zytoplasmas ein. Die Mitochondrien sind von einer Doppelmembran begrenzt. Die äußere Membran enthält Transmembranproteine (Porine), durch die Ionen und kleinere Moleküle diffundieren können sowie Rezeptoren für den spezifischen Proteinimport. Die Oberfläche der inneren Membran wird durch Einfaltungen (Cristae) stark vergrößert, ist im Gegensatz zur äußeren Membran aber nicht permeabel. Dafür sind in der inneren Membran aber spezielle Transportsysteme lokalisiert, wie der ATP-ADP-Austauscher oder die Transporter für Malat, Phosphat und Pyruvat. Außerdem enthält die innere Membran die Enzyme der Atmungskette und die ATP-Synthase (F_1F_0 -ATPase). Die beiden Membranen sind durch den Intermembranraum separiert, der ebenfalls spezifische Enzyme enthält, wie z.B. die Adenylatzyklase. Im Innenraum der Mitochondrien (Matrix) sind die Enzyme des Zitratzyklus, die β -Oxidation oder der Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex lokalisiert (Abbildung 2.5).

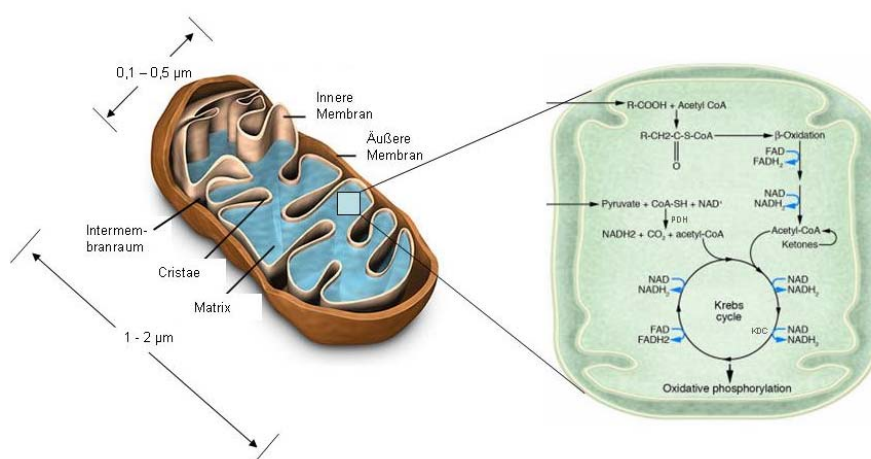


Abbildung 2.5: Schemazeichnung eines typischen Mitochondriums (links) und Übersicht der wichtigsten Energiestoffwechselwege in der Matrix (rechts). Der Pyruvat-Dehydrogenase Komplex (PDH) katalysiert die Dekarboxylierung von Pyruvat und überträgt die Acetyl-Gruppe auf das Coenzym A. Im Zitratzyklus katalysiert der Ketoglutarat-Dehydrogenase-Komplex (KDC) die Dekarboxylierung von Ketoglutarat, wobei Succinat entsteht und die freiwerdenden Elektronen im NADH gespeichert werden. [Abbildung modifiziert nach www.interklasa.pl/meteo/komorka/images/]

Der oxidative Metabolismus in den Mitochondrien beginnt durch die Aufnahme von Pyruvat und Fettsäuren aus dem Zytoplasma in die Matrix. Das Pyruvat wird durch den Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex dekarboxyliert und die verbleibende Acetyl-Gruppe auf Coenzym A übertragen. Der weitere oxidative Abbau des so entstandenen Acetyl-CoA erfolgt im Zitratzyklus. Der Zitratzyklus ist eine Abfolge von sieben aufeinander folgenden Reaktionen, wobei die beiden Kohlenstoffatome der Acetyl-Gruppe zu CO_2 oxidiert und die energiereichen Elektronen in drei Molekülen NADH sowie einem Molekül FADH_2 gespeichert werden. NADH und FADH_2 übertragen ihre Wasserstoffatome auf die in der inneren Mitochondrienmembran lokalisierte Atmungskette. Die Atmungskette besteht aus einer Serie von Redoxsystemen, die die Elektronen schrittweise auf molekularen Sauerstoff übertragen. Die dabei freiwerdende Energie nutzen Protonenpumpen, um Protonen durch die innere Membran von der Matrix in den Intermembranraum zu befördern. Es entsteht ein elektrochemischer Gradient über der inneren Membran. Der Rückfluss von Protonen entlang des Gradienten treibt die ATP-Synthase an, die die Umwandlung von $\text{ADP} + \text{P}_i$ zu ATP katalysiert.

Mitochondrien sind die einzigen eukaryontischen Organellen mit einem eigenen Genom. Das mitochondriale Genom besteht aus mehreren Kopien eines doppelsträngigen, zirkulären DNA-Moleküls mit einer Größe von 16,6 kb, das für 13 Polypeptidketten der Atmungskette kodiert, sowie für 2 rRNAs und 22 tRNAs. Alle anderen Enzyme, die für die mitochondrialen Funktionen benötigt werden, sind im Kerngenom kodiert

Mitochondriale Proteine, die im Kerngenom kodiert sind, werden im Zytoplasma translatiert und dann spezifisch in die Mitochondrien transportiert. Dafür tragen die Proteine eine 20 - 80 Aminosäure lange Präsequenz am N-Terminus, die ein Signalpeptid enthält und für den Transport des Proteins in die Mitochondrien essentiell ist. Die Signalpeptide haben keine Konsensus-Sequenz, allerdings gibt es bestimmte einheitliche Motive in der Primär- und Sekundärstruktur der Präsequenzen. Sie besitzen normalerweise einen hohen Anteil basischer, hydrophober und hydroxylierter Aminosäuren [von Heijne et al. 1989] und bilden in der Regel eine amphipatische α -Helix mit einer positiv geladenen und einer hydrophoben Seite [Neupert 1997]. Proteine mit einem mitochondrialen Signalpeptid werden im Zytoplasma von Chaperonen gebunden, um die Struktur zu stabilisieren und den Kontakt zu den Translokationskomplexen zu vermitteln. Das Proteintransportsystem der äußeren mitochondrialen Membran ist der TOM-Komplex, der als Rezeptor für die Signalpeptide dient und die Translokationspore für die Proteine bildet. Im Intermembranraum bindet die Präsequenz an die Translokationskomplexe der inneren mitochondrialen Membran (TIM-Komplex) [Truscott et al. 2003]. Die Translokation über die innere Membran ist energieabhängig. Zum einen wirken die elektrostatischen Kräfte des Membranpotentials, das auf der Innenseite negativ ist, auf die positiv geladene Präsequenz [Martin et al. 1991]. Zum anderen wird die Präsequenz, sobald sie in die Matrix gelangt, von dem Chaperon mtHSP70 gebunden. Durch Hydrolyse von

ATP wird im mtHSP70 eine Konformationsänderung ausgelöst, die dabei hilft, das Protein durch die Translokationspore zu ziehen [Voisine et al. 1999]. Nach dem Transport werden die aminoterminalen Präsequenzen von Zink-abhängigen Metalloendopeptidasen prozessiert [Gakh et al. 2002] (Abbildung 2.6).

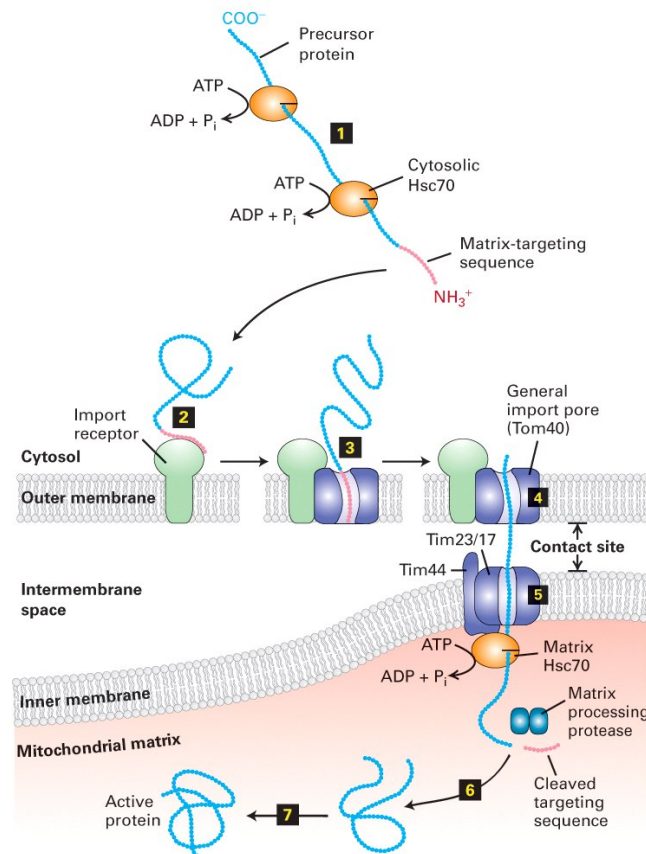


Abbildung 2.6: Import von Proteinen aus dem Zytosol in die mitochondriale Matrix. Die neu synthetisierten Proteine binden im Zytosol an Chaperone (1) und die aminoterminalen Signalsequenz wird von Importrezeptoren in der äußeren Mitochondrienmembran erkannt (2), die gleichzeitig auch die Transpore bilden (3). Der energieabhängige Transport über die innere Membran wird zum einen vom elektrochemischen Gradienten angetrieben und andererseits von ATP-abhängigen Chaperonen in der Matrix (4 + 5). Nach dem Transport wird die Signalsequenz von Metalloproteasen prozessiert (6). [Abbildung entnommen aus „*Molecular Cell Biology, 5th Edition*“, Lodish et al.]

2.2.1 Mitochondriopathien

Mitochondriopathien (MCP) sind Erkrankungen mit Störungen in folgenden Stoffwechselwegen: im Bereich des Pyruvat-Dehydrogenase-Komplexes, im Zitratzyklus, in der Atmungskette, der ATP-Synthase sowie den zahlreichen mitochondrialen Transportsystemen. MCPs haben eine Prävalenz von 1:25.000 [Finsterer 2004] und können ein großes Spektrum klinischer Phänotypen verursachen, verschiedene Organe betreffen und zu jedem Zeitpunkt in der Entwicklung auftreten, von der frühen Embryogenese bis ins hohe Alter [Leonard and Sschapira 2000; Wolf and Smeitnik

2002] (Tabelle 2.2). Da die Hauptaufgabe der Mitochondrien die ATP-Erzeugung ist, sind besonders energieabhängige Organe wie Muskeln, Herz, Gehirn und Leber betroffen. Daher sind bei vielen Patienten neuromuskuläre Störungen zu beobachten [Wolf and Smeitink 2004].

Neurologische	Migräne, Schlaganfall, Epilepsie, Demenz, Myopathie, periphere Neuropathie (Ataxie), Sprachstörungen, zentrale Hörstörungen
Gastro-Intestinale	Verstopfung, Reizdarm, Erbrechen, Schluckstörungen
Kardiale	Herzinsuffizienz, Kardiomyopathie, Reizleitungsstörungen, biventrikuläre Hypertrophie
Respiratorische	Atembeschwerden, Hypoventilation, Pneumonie, Apnoe
Endokrinologische	Diabetes mellitus, Schilddrüsenstörungen, Defekte der Eierstöcke, Störungen der Nebenniere, Kleinwüchsigkeit
Hämatologische	Anämie
Renale	Nierenversagen
Hepatische	Leberversagen
Ophthalmologische	Optikusatrophy, Linsentrübung, Lähmung der Augenmuskeln

Tabelle 2.2: Häufige Symptome von Mitochondriopathien. [entnommen und modifiziert aus *Mitochondriopathies*“, J. Finsterer, 2004]

MCPs haben häufig eine genetische Ursache und werden entweder als primäre MCPs bezeichnet, wenn die pathogene Mutation im mitochondrialen Genom lokalisiert ist, oder aber bei Mutationen im Kerngenom als sekundäre MCPs. Zusätzlich zu den genetischen Unterschieden werden MCPs anhand biochemischer oder klinischer Kriterien klassifiziert. Bei den biochemischen Kriterien werden Defekte im mitochondrialen Transport, Defekte des Zitratzyklus, Defekte der Atmungskette oder der oxidativen Phosphorylierung unterschieden. Die klinischen Kriterien werden unterteilt in Krankheiten, die nur ein Organ betreffen oder bei denen mehrere Organsysteme beeinträchtigt sind [Finsterer 2004].

Zu den ersten Syndromen, die auf Mutationen im mitochondrialen Genom zurück geführt wurden, zählten das Kearns-Sayre-Syndrom (KSS) und die Lebersche hereditäre Optikusneuroretinopathie (LHON), eine spezielle Form der Sehnervschädigung [Wallace et al. 1988]. KSS ist charakterisiert durch Defekte in der Augenentwicklung, einer Degeneration des zentralen Nervensystems und Reizleitungsstörungen im Herzen. Ausgelöst wird das KSS durch große Deletionen in der mitochondrialen DNA [Schapira and Cock 1999].

Da aber ein Großteil der mitochondrialen Proteine im Kerngenom kodiert ist, ist es nicht verwunderlich, dass bis heute schon mehr als 30 nukleäre Gene bekannt sind, die mitochondriale Krankheiten verursachen. Zu den MCPs, die auf Mutationen in nukleären Genen zurückzuführen sind, gehört u.a. das Leigh-Syndrom. Das Leigh-Syndrom ist eine schon früh in der Kindheit auftretende neurodegenerative Erkrankung, die u.a. charakterisiert ist durch Muskelschwäche, Hypotonie, Augensymptome und Atemstörungen. Rutledge et al. konnten 1981 nachweisen, dass bei vielen Patienten zusätzlich noch eine hypertrophe Kardiomyopathie diagnostiziert werden kann. Das Leigh-Syndrom wird durch Mutationen in nukleären Genen verursacht, die eine wichtige Rolle im Energiemetabolismus, der oxidativen Phosphorylierung und ATP-Produktion spielen. Mutationen finden sich in Genen, die für die Komplexe der Atmungskette kodieren oder im Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex.

In den letzten Jahren wurde eine Vielzahl von Mausmodellen generiert, um humane mitochondriale Krankheiten nachzuahmen, das Verständnis von deren Pathogenese zu verbessern und um mögliche therapeutische Ansätze zu finden [Wallace 2001]. Die genetische Inaktivierung des mitochondrialen Transkriptionsfaktors (Tfam) im Herzen, der für die Replikation der mtDNA essentiell ist, war neonatal letal, ausgelöst durch dilatative Kardiomyopathie [Wang et al. 1999]. Auch Mäuse mit einer Defizienz im Gen für Mn-Superoxid-Dismutase (MnSOD), die für die Vernichtung von Sauerstoffradikalen in den Mitochondrien wichtig ist, starben innerhalb der ersten Tage nach der Geburt an dilatativer Kardiomyopathie [Li et al. 1995]. Die genetische Inaktivierung des Adenin-Nukleotid-Austauschers (Ant1) bewirkte eine Inhibierung der Atmungskette und eine damit verbundene Abnahme an ATP sowie eine gesteigerte Produktion gefährlicher Sauerstoffradikale und resultierte in der Entwicklung einer hypertrophen Kardiomyopathie [Graham et al. 1997].

2.3 Dihydrolipoamid-Dehydrogenase (DLD)

Das Gen für Dihydrolipoamid-Dehydrogenase (DLD) umfasst 14 Exons, die sich über etwa 20 kb auf Chromosom 7q31.1 erstrecken. Die mRNA, bestehend aus 1527 bp, kodiert für ein etwa 55 kDa großes Protein [Feigenbaum and Robinson 1993]. Die Dihydrolipoamid-Dehydrogenase (EC 1.8.1.4) gehört zur Familie der Pyridin-Nukleotid-Disulfid-Oxidoreduktasen. In der aktiven Form bildet die Dihydrolipoamid-Dehydrogenase ein Homodimer mit jeweils einem reaktiven Disulfid und einem kovalent gebundenen Flavin als Kofaktor [Toyoda et al. 1998]. In Eukaryonten ist die Dihydrolipoamid-Dehydrogenase an vier verschiedenen Multienzymkomplexen beteiligt – dem Glycin-Abbau-System (GCS) und drei α -Ketosäure-Dehydrogenase-Komplexen: dem Pyruvat-

Dehydrogenase-Komplex (PDC), dem α -Ketoglutarat-Dehydrogenase-Komplex (KDC) und dem *Branched-Chain* α -Ketosäure-Dehydrogenase-Komplex (BCKDC). Alle vier Komplexe sind in der mitochondrialen Matrix lokalisiert, assoziiert mit der inneren Mitochondrienmembran. Die Komplexe bestehen aus jeweils drei katalytischen Komponenten: der α -Ketosäure-Dehydrogenase (E1), der Dihydrolipoamid-Acyltransferase (E2) und der Dihydrolipoamid-Dehydrogenase (E3) (Abbildung 2.7 A). Der Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex besteht aus einem Kern von 60 E2-Proteinen, auf dem sich dann 30 E1-Dimere und 6 E3-Dimere zusammensetzen [Robinson 2001]. Die E1-Komponente katalysiert die Dekarboxylierung des jeweiligen Substrates und überträgt dabei eine Acetylgruppe auf die kovalent an E2 gebundene Lipoylgruppe. Die E2-Komponente überträgt die Acetylgruppe auf Coenzym A bei gleichzeitiger Reduktion der Liponsäure. Die Reoxidation der Liponsäure erfolgt im letzten Schritt durch E3, wobei die Elektronen auf NAD^+ übertragen werden (Abbildung 2.7 B). Zwei der vier Multienzymkomplexe katalysieren Reaktionen bei der Oxidation von Aminosäuren, Fettsäuren und Kohlenhydraten. PDC katalysiert die Dekarboxylierung von Pyruvat und das dabei entstehende Produkt Acetyl-Coenzym A dient dann als Ausgangsprodukt für den Zitratzyklus. KDC katalysiert im Zitratzyklus die Dekarboxylierung von α -Ketoglutarat zu Succinyl-CoA. Die beiden anderen Komplexe, in denen die Dihydrolipoamid-Dehydrogenase aktiv ist, katalysieren wichtige Schritte im Katabolismus spezieller Aminosäuren. Der BCKDC katalysiert einen irreversiblen Schritt im Metabolismus von Leucin, Isoleucin und Valin und das GCS ist in die Synthese und Degradation von Glycin involviert [Patel and Harris 1995].

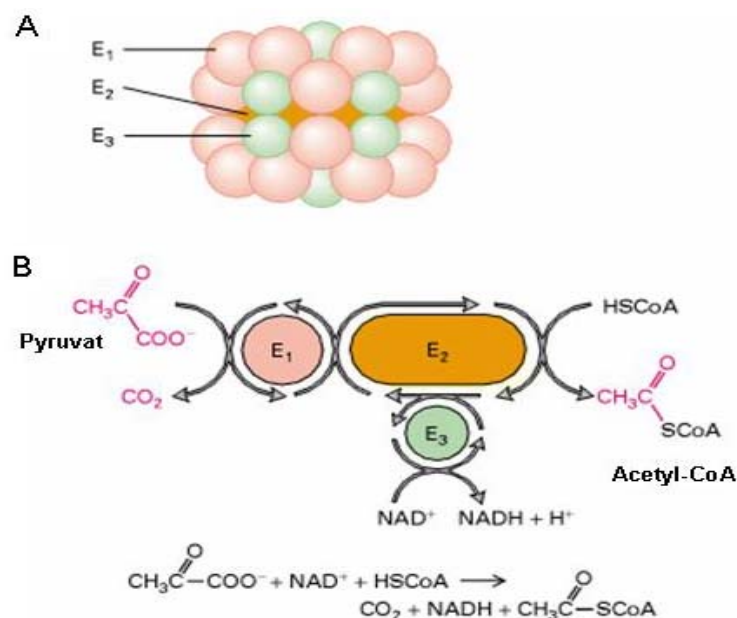


Abbildung 2.7: A: Modell des Pyruvat-Dehydrogenase-Komplexes (PDC). Die Transacetylase (E2) ist orange dargestellt, die Pyruvat-Dehydrogenase (E1) rosafarben und die Dihydrolipoamid-Dehydrogenase (E3) grün. B: Der PDC katalysiert die Dekarboxylierung des Pyruvats und überträgt die Acetyl-Gruppe auf Coenzym A. Dabei werden Elektronen auf NAD^+ übertragen. [Abbildung entnommen aus „*Molecular Cell Biology 4th ed (2000)*“, Lodish et al.]

Da E3 an wichtigen enzymatischen Reaktionen des Energie- und Aminosäuremetabolismus beteiligt ist, wirken sich Mutationen in dem Enzym schädlich auf den Organismus aus. Mäuse, denen das DLD-Gen fehlt ($DLD^{-/-}$), sterben schon vor der Geburt; allerdings erscheinen heterozygote Mäuse mit einem normalen Wildtyp-Allel ($DLD^{+/-}$) phänotypisch normal [Johnson et al. 1997].

Mutation	Enzymaktivität	Lokalisation	Klinischer Phänotyp	Kommentar	Referenz
K37E	6%	FAD-Bindungs Domäne	MSUD, neurologische Defekte	<i>Compound Heterozygotie</i> mit P453L	Liu et al. 1993
I47T		FAD-Bindungs Domäne	Encephalopathie, Microcephalie, Laktatazidose	<i>Compound Heterozygotie</i> mit G229C oder E375K	Cameron et al. 2006
105InsA	14%	Stop-Codon im Signalpeptid	MSUD, Entwicklungsstörung, Hypotonie, Azidose	<i>Compound Heterozygotie</i> mit R460G	Hong et al. 1996
G229C	9-21%	Dimerisation	MSUD, Encephalopathy, Neurologisch Schäden, Muskelhypotonie	Homozygot oder <i>Compound Heterozygotie</i> mit 105InsA	Shaag et al. 1999
M361V	5%	FAD-Bindungs Domäne	MSUD, Hypotonie, Laktatazidose	<i>Compound Heterozygotie</i> mit E375K	Cerna et al. 2001
E375K	5%	FAD-Bindungs Domäne	MSUD, Hypotonie, Laktatazidose	<i>Compound Heterozygotie</i> mit M361V	Cerna et al. 2001
I393T	29%	Dimerisation	Leigh-Syndrom	<i>Compound Heterozygotie</i> mit IVS9+1G-A	Grafakou et al. 2003
P453L	6%	Aktives Zentrum	MSUD, neurologische Defekte	<i>Compound Heterozygotie</i> mit K37E	Liu et al. 1993
R460G	14%	Dimerisation	MSUD, Entwicklungsstörung, Hypotonie, Azidose	<i>Compound Heterozygotie</i> mit 105InsA	Hong et al. 1996
D479V	7-15%	Dimerisation	Neurologische Schäden	homozygot	Odievre et al. 2005
R482G	20%	Dimerisation	Cortical Atrophy, Hypotonie, HCM	homozygot	Odievre et al. 2005
IVS9+1G-A	29%		Leigh-Syndrom	<i>Compound Heterozygotie</i> mit I393T	Grafakou et al. 2003

Tabelle 2.3: Pathogene Mutationen im Gen DLD; MSUD = *maple syrup urine disease*; HCM = hypertrophe Kardiomyopathie

Bisher sind mehrere Mutationen im DLD-Gen beim Menschen bekannt, die in einer E3-Defizienz resultieren (Tabelle 2.3). Bei allen bisher bekannten Fällen tragen beide Allele eine Mutation im DLD. Klinisch ist eine E3-Defizienz durch eine Vielzahl verschiedener Phänotypen gekennzeichnet. Die meisten Patienten entwickeln schon kurz nach der Geburt erste neurologische Defekte wie Mikrocephalie und Leigh-Syndrom, die dann in ihrem Verlauf zu geistigen Behinderungen, Ataxie, Muskelhypotonie und Laktatazidose führen können. Begleitet werden diese Symptome in der Regel durch einen erhöhten Plasmaspiegel an Pyruvat sowie eine erhöhte Konzentration von α -Ketonsäuren im Urin. Es wurden aber auch Patienten beschrieben, bei denen kein erhöhter Pyruvatspiegel und keine gesteigerte Ausscheidung von α -Ketonsäuren nachweisbar war [Odievre et al. 2005]. Selten manifestiert sich die Krankheit erst später im Leben und ist dann häufig mit Leberversagen und Myoglobinuria assoziiert. Soweit bisher bekannt ist die E3-Defizienz eine rezessive Erkrankung. In den häufigsten Fällen sind die beiden Allele von zwei verschiedenen pathogenen Mutationen betroffen (*Compound Heterozygotie*) und es ist noch eine geringe Enzymaktivität nachweisbar. Interessanterweise sind auch Patienten mit einer E3-Defizienz beschrieben worden, in denen keine Verminderung der Aktivität des Pyruvat-Dehydrogenase-Komplexes nachweisbar war [Cameron et al. 2006].

2.4 A-Typ Lamine

Lamine gehören zur Familie der Intermediärfilament-Proteine und sind Hauptbestandteil der Lamina, einem unterhalb der inneren Kernmembran liegenden Netzwerk aus Proteinen (Abbildung 2.8). Es gibt zwei Typen von Laminen: die A- und B-Typ Lamine. Die vier A-Typ Proteine – Lamin A, C, A δ 10 und C2 – entstehen durch alternatives Spleißen von einem einzigen Gens. Das Lamin A/C-Gen (LMNA) ist auf dem langen Arm von Chromosom 1 lokalisiert (1q21.2) [Wydner et al. 1996], umfasst 12 Exons und erstreckt sich über 24 kb [Lin und Worman 1993]. Die Expression der A-Typ Lamine ist entwicklungsabhängig und beschränkt sich größtenteils auf bereits differenzierte und nicht mehr proliferierende Zellen [Broers et al. 1997].

Die Lamina dient als mechanische Stütze für den Nukleus und erfüllt multiple funktionelle Aufgaben. Lamine interagieren mit vielen Proteinen der inneren Kernmembran (INM), wie z.B. mit Emernin [Clemens et al. 2000] und den Lamina-assoziierten Proteinen (LAP) [Chu et al. 1998], wodurch sie eine wichtige Rolle bei deren Lokalisation spielen. In Lamin-defizienten Zellen konnte eine Fehlverteilung der Kernporen beobachtet werden [Lenz et al. 1997] und durch eine zunehmende Änderung der Zellkernmorphologie kann auch der Import einzelner Kernproteine beeinträchtigt

werden [Nikolova et al. 2004]. Darüber hinaus können Lamine spezifische DNA-Sequenzen [Luderus et al. 1994] oder Chromatin-assoziierte Proteine wie Histone binden [Taniura et al. 1995] und wirken an der Organisation des Chromatins mit. Da die Chromatin-Organisation Einfluss auf die Genexpression hat, könnte die Regulation spezifischer Gene von der Lamina abhängig sein [Spann et al. 2002]. Lamina-Proteine könnten auch die DNA-Replikation beeinflussen. Die Expression mutierter Lamine führt zu einer Reorganisation der endogenen Laminstrukturen und inhibiert die DNA-Replikation [Moir et al. 2000]. Außerdem interagiert die Lamina mit dem muskelspezifischen Intermediärfilament Desmin. In Kardiomyozyten von LMNA-defizienten Mäusen lässt sich eine Disorganisation des Desminnetzwerkes beobachten und damit auch eine Destabilisierung der Myofibrillen. [Nikolova et al. 2004].

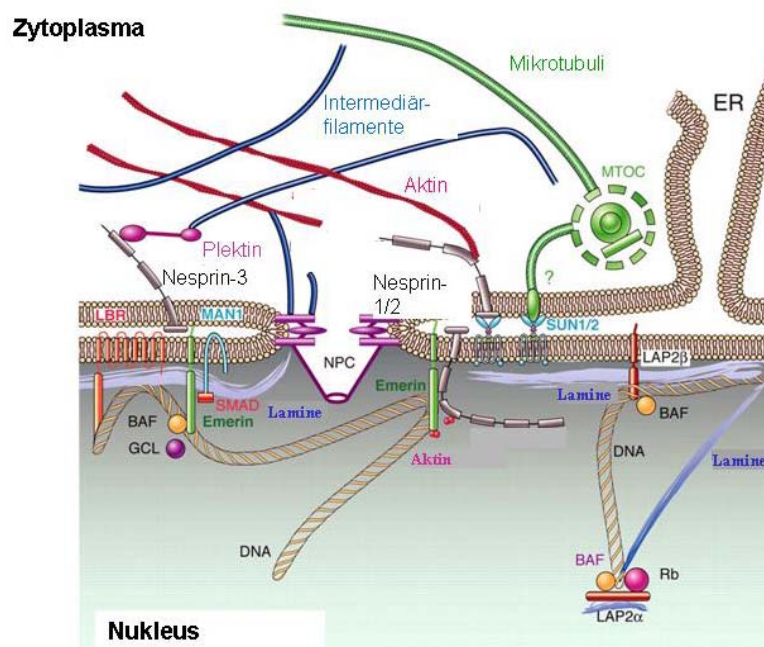


Abbildung 2.8: Lokalisation und Interaktionspartner der Lamine. Lamine binden direkt an die Lamina-assoziierten Proteine (LBR, LAP2, Emerin, MAN1, Nesprins-1 and -2), aber auch an Histone und DNA. [Abbildung entnommen aus *“Nuclear Lamins: Laminopathies and Their Role in Premature Ageing”*, Broers et al.]

Träger pathogener Mutationen im LMNA sind charakterisiert durch eine extrem variable Ausprägung klinischer Phänotypen, die unter dem Begriff der Laminopathien zusammengefasst werden. Diese Krankheiten können den Skelettmuskel oder die Herzmuskulatur betreffen. Dazu zählen die Emery-Dreifuss Muskeldystrophie (EDMD, OMIM 181350), die Gliedergürtel-Muskeldystrophie (LGMD-1B, OMIM 159001) und die dilatative Kardiomyopathie mit Reizleitungsstörungen (DCM-CD, OMIM 115200). Zwei weitere Krankheitsbilder sind die Dunnigan's familiäre Lipodystrophie (FPLD, 151660) und die Mandibuloakral Dysplasie (MAD, OMIM 248370), die charakterisiert sind durch eine Fehlverteilung von Fettgewebe. Auch eine Neuropathie, das Charcot-Marie-

Tooth Syndrom (CMT2B1, OMIM 605588), bei der die peripheren Nerven geschädigt sind und es zu einem Abbau der betroffenen Muskulatur kommt, sowie die Hutchinson-Gilford Progerie (OMIM 176670), eine Krankheit, die vorzeitiges Altern verursacht und die zum Tod durch Herzinfarkt oder Schlaganfall führt, wurden mit Mutationen im LMNA assoziiert. Interessanterweise gibt es Überlappungen der Phänotypen zwischen den verschiedenen Laminopathien. Bei einem Großteil der Patienten mit Skelettmuskelschwäche entwickeln sich zusätzlich kardiale Anomalien wie Reizleitungsstörungen, Arrhythmien und DCM. Die Dilatative Kardiomyopathie ist in Trägern von LMNA-Mutationen auch mit Lipodystrophie und Neuropathien assoziiert [Sylvius and Tesson 2006].

Die erste pathogene LMNA-Mutation wurde in Zusammenhang mit der autosomal-dominanten Form der Emery-Dreifuss Muskeldystrophie beschrieben [Bonne et al. 1999], die durch Verkürzungen der Nacken-, Ellbogen- und Achillessehnen sowie Reizleitungsstörungen im Herzen charakterisiert ist. Bisher wurden annähernd 200 Mutationen im Gen für Lamin A/C identifiziert [Sylvius and Tesson 2006]. Die meisten der beschriebenen autosomal-dominanten LMNA-Mutationen sind Missense-Mutationen. Es wird angenommen, dass die mutierten Proteine exprimiert werden und über einen dominant-negativen Mechanismus wirken. Das bedeutet, dass die mutierten Proteine in die Lamina integriert werden, wodurch die Struktur der Lamina gestört oder die Interaktionen der Lamina mit anderen Proteinen beeinträchtigt werden könnten. Ein geringer Teil der LMNA-Mutationen sind Nonsense-Mutationen oder Frameshift-Mutationen, die zur Insertion eines vorzeitigen Stop-Codons führen. Es wird diskutiert, ob diese Mutationen exprimiert werden und dann über einen dominant-negativen Mechanismus wirken. Allerdings gibt es auch Hinweise darauf, dass Transkripte mit einem vorzeitigen Stop-Codon erkannt und abgebaut werden [Muchir et al. 2003].

Korrelationen zwischen dem Ort der Mutation innerhalb des Gens und der klinischen Ausprägung – Genotyp-Phänotyp-Korrelationen – konnten bislang nicht hergestellt werden. Es gibt verschiedene Hypothesen, die versuchen, die Mechanismen der Pathogenese von LMNA-Mutationen zu beschreiben und zu erklären, wie sich verschiedene Krankheitsbilder durch Mutationen in nur einem Gen entwickeln können. Erstens könnten mutierte Lamine durch abnormale Interaktionen mit anderen Proteinen der Lamina oder der INM strukturelle Veränderungen der Lamina begünstigen, wodurch die Stabilität der INM geschwächt werden könnte. Die Schwächung könnte besonders in Zellen mit hoher mechanischer Beanspruchung, wie z.B. in Kardiomyozyten oder im Skelettmuskel, zur Zerstörung des Nukleus und nachfolgend zur Apoptose führen. Unterstützt wird diese These durch die Beobachtung, dass in Fibroblasten von Patienten mit LMNA-Mutationen Nuklei mit unnormaler Morphologie beschrieben wurden [Favreau et al. 2003]. Zweitens könnte eine beeinträchtigte Interaktion der Lamine mit Chromosomen und Transkriptionsregulatoren, wie z.B. dem

Retinoblastoma-Protein [Ozaki et al. 1994] oder SREBP1 [Lloyd et al. 2002], Einfluss auf die zelltyp-spezifische Genexpression haben. Das Retinoblastoma-Protein greift in die Differenzierung von Muskel-Stammzellen ein, während SREBP1 für die Aktivierung von Genen, die im Lipidmetabolismus involviert sind, benötigt wird. So könnten verschiedene LMNA-Mutationen die Expression unterschiedlicher gewebsspezifischer Gene regulieren. Zusammen mit anderen individuellen Faktoren der Genexpression wäre dies auch eine mögliche Erklärung, warum durch eine einzige Mutation verschiedene Gewebe betroffen sein können [Sylvius et al. 2005]. Drittens wird über eine Störung der Verbindung zwischen Lamina und Zytoskelettproteinen (Desminfilamente) spekuliert, resultierend in einer Degeneration des Desminnetzwerkes. Desminfilamente verbinden die Z-Scheiben der Sarkomere sowohl mit dem Sarkolemma als auch der Kernmembran. Wird die Verankerung der Desminfilamente an die Kernmembran geschwächt, könnte dies eine Desorganisation der Myofibrillen und damit eine mangelhafte Kraftübertragung in den Kardiomyozyten zur Folge haben [Nikolova et al. 2004] [Broers et al. 2004].

Mittlerweile wurde eine Reihe von Tiermodellen generiert mit dem Ziel, die molekularen Pathomechanismen von LMNA-Mutationen zu erklären. LMNA-defiziente Mäuse (LMNA^{-/-}) sind bei Geburt von Wildtyp-Mäusen nicht zu unterscheiden, entwickeln aber nach zwei bis drei Wochen einen Phänotyp, der dem einer Emery-Dreifuss Muskeldystrophie ähnlich ist, gefolgt von einer dilatativen Kardiomyopathie mit Reizleitungsstörungen. Fibroblasten von LMNA^{-/-} Mäusen zeigen Abnormalitäten der Kernmembran, ähnlich denen in Fibroblasten von FPLD-Patienten [Vigouroux et al. 2001]. Interessanterweise zeigen heterozygote Mäuse zu Beginn keine auffälligen Veränderungen [Sullivan et al. 1999]. Gezielte Inaktivierung der Metalloprotease Zmpste24, die in die Prozessierung des C-terminalen Endes von Lamin A involviert ist, führt bei Mäusen zur Entwicklung von Muskeldystrophie und dilatativer Kardiomyopathie [Pendas et al. 2002].

2.5 Kopplungsanalyse

Die somatischen Zellen des Menschen sind diploid. Die Keimzellen der Eltern dürfen allerdings nur einen haploiden Chromosomensatz aufweisen, da sich der Chromosomensatz sonst in jeder Generation verdoppeln würde. Während der Reifung der Gameten muss der Chromosomensatz also halbiert werden. Diese als Meiose bezeichnete Reduktionsteilung beginnt mit der Paarung der homologen Chromosomen. Dabei bilden die jeweiligen mütterlichen und väterlichen Homologe Überkreuzungsstrukturen (Crossover), die den Austausch von genetischem Material ermöglichen. Die dadurch entstehenden neuen Allelkombinationen tragen erheblich zur genetischen Variabilität

der Spezies bei. Rekombinationen treten mit einer Regelmäßigkeit auf, die wenigstens zwei Crossover-Ereignisse pro Chromosom und Meiose garantiert.

Nach den mendelschen Regeln werden Allele auf verschiedenen Chromosomen mit einer Wahrscheinlichkeit von 50 % zusammen vererbt. Dagegen werden Allele, die auf einem Chromosom liegen, häufig zusammen vererbt (Genkopplung). Allerdings können durch die auftretenden Rekombinationsereignisse auch Allele eines Chromosoms unabhängig voneinander vererbt werden. Die Wahrscheinlichkeit, dass zwei Allele auf demselben Chromosom gemeinsam vererbt werden, steht in Relation zu ihrem Abstand. Je geringer die physikalische Distanz zwischen zwei Allelen auf einem Chromosom, desto unwahrscheinlicher ist die Trennung durch ein Rekombinationsereignis. Die Wahrscheinlichkeit, mit der ein Rekombinationsereignis zwischen zwei gegebenen Allelen stattfindet, wird als Rekombinationsfraktion θ bezeichnet. Die Werte für die Rekombinationsfraktion variieren zwischen $\theta = 0$ für dicht benachbarte Allele, die nur zusammen vererbt werden, und $\theta = 0,5$ für Allele, die auf verschiedenen Chromosomen lokalisiert sind. Die Rekombinationsfraktion wird zur Bestimmung genetischer Distanzen und zur Erstellung der linearen Anordnung von genetischen Loci auf einem Chromosom herangezogen. Nach der Definition von Morgan entspricht eine Rekombinationsfraktion von 1 % der genetischen Distanz von 1 Zentimorgan (cM).

Ein Ziel der Kopplungsanalyse ist die Kartierung eines Locus, der mit einem speziellen phänotypischen Merkmal segregiert. Dies ermöglicht die Eingrenzung eines krankheitsverursachenden Gens auf einen bestimmten chromosomalen Abschnitt. Als genetische Marker für die Kopplungsanalyse werden bevorzugt polymorphe Mikrosatelliten verwendet. Mikrosatelliten sind Folgen repetitiver Sequenzeinheiten, bestehend aus zwei bis vier Basenpaaren. Aufgrund ihrer gleichmäßigen Verteilung über das gesamte Genom [Tautz 1989] und ihrer Heterozygotie haben Mikrosatelliten einen hohen Informationsgehalt für die Kopplungsanalyse [Weber und Wong 1993]. Die Heterozygotie der Mikrosatellitenmarker variiert abhängig von der Länge und Basenzusammensetzung der Wiederholungseinheit [Chakraborty et al. 1997], der Anzahl der Wiederholungseinheiten [Wierdl et al. 1997] und der Genauigkeit der Wiederholungen [Petes et al. 1997].

Für die statistische Auswertung der Kopplungsanalyse werden informative Meiosen benötigt, d.h. dass die Allele des Kindes eindeutig dem jeweiligen Elternteil zuzuordnen sind. Da dies aber nicht in jedem Fall gegeben ist, wird für die Gesamtheit aller Familienmitglieder einerseits die Wahrscheinlichkeit $L(\theta)$ berechnet, mit der ein gegebener Genotyp mit der Krankheit gekoppelt ist, und andererseits die Wahrscheinlichkeit $L(0,5)$, dass keine Kopplung zwischen Marker und dem beobachteten Genotyp besteht. Das Verhältnis dieser beiden Wahrscheinlichkeiten drückt die Chance für eine Kopplung aus (*odds of linkage*).

Der Wert des Quotienten, gewöhnlich als Logarithmus angegeben, wird als LOD-Score (*logarithm of the odds*) bezeichnet.

$$Z(\theta) = \log_{10} \frac{L(\theta)}{L(0,5)}$$

Bei autosomal dominanten Erbgängen wird allgemein ein LOD-Score ≥ 3 als Evidenz für eine Kopplung gewertet, bei einer Fehlerwahrscheinlichkeit von 5 %. Das entspricht einer Wahrscheinlichkeit von 1.000:1, dass ein Marker mit der Krankheit zusammen vererbt wird. Für einen LOD-Score ≤ -2 kann Kopplung ausgeschlossen werden [Ott 1999].

2.6 Nonsense-mediated mRNA decay (NMD)

In eukaryontischen Zellen durchlaufen die primären mRNA-Transkripte eine Reihe von Prozessierungsschritten, bevor sie in Proteine translatiert werden. Kontrolliert werden diese Schritte durch den Prozess der mRNA-Überwachung. Dieser Prozess sortiert unter anderem Transkripte aus, die noch Introns enthalten, bei denen Exons fälschlicherweise herausgespleißt wurden oder Transkripte mit fehlerhaften regulatorischen Elementen in der 5'-UTR und der 3'-UTR. Ein weiterer wichtiger Aspekt der mRNA-Überwachung ist die Erkennung vorzeitiger Stop-Codons (PTC) und der Abbau der entsprechenden mRNA (*nonsense-mediated mRNA decay* – NMD; Abbildung 2.9).

Im Nukleus binden Cap-bindende Proteine (CBP80 und CBP20) an das 5'-Ende der Prä-mRNA und an das 3'-Ende Poly(A)-bindende Proteine (PABP2) [Maquat 2004]. Bei der Prozessierung der Prä-mRNA werden die Introns entfernt und gleichzeitig initiieren die Spleißosomen 20-24 Nukleotide stromaufwärts der Exon-Exon Grenze die Anlagerung eines Proteinkomplexes (*exon junction complex* – EJC) [Le Hir et al. 2000]. Der resultierende Komplex aus mRNA und Ribonukleoproteinen (mRNP) wird aus dem Nukleus in das Zytoplasma transportiert und bindet Translationsinitiationsfaktoren, wodurch die Ribosomen rekrutiert werden, die die erste Translationsrunde initiieren [Ishigaki et al. 2001]. Ist die mRNA funktionsfähig und kodiert kein PTC, kommt es zu einer Umgestaltung des mRNPs, so dass letztendlich ein stabiler Translations-Komplex entsteht [Lejeune et al. 2002]. Dagegen wird der NMD initiiert, wenn das Ribosom während der ersten Runde der Translation ein PTC erreicht, das mindestens 50-55 Nukleotide stromaufwärts der letzten Exon-Exon Grenze kodiert ist, so dass während der ersten Runde der Translation nicht alle gebildeten EJC's durch die Ribosomen entfernt werden [Nagy and Maquat 1998]. Der NMD auslösende Mechanismus bleibt noch zu identifizieren. Allerdings kommt es zur Assoziation der NMD-Faktoren Upf1, Upf2 und Upf3, die für den NMD essentiell sind, mit dem Translationskomplex [Le Hir et al.

2001]. Die Bindung der NMD-Faktoren stimuliert die Hydrolyse der Peptidkette und fördert die Dissoziation der ribosomalen Untereinheiten [Amrani et al. 2006]. Die Degradation der mRNA erfolgt vom 5'-Ende her durch Entfernung der Cap-Struktur, gefolgt von einem Exonuklease-Abbau in 5'-3'-Richtung als auch vom 3'-Ende her durch Abbau des Poly(A)-Schwanzes, gefolgt von einem Exonuklease-Abbau in 3'-5'-Richtung [Lejeune et al. 2003].

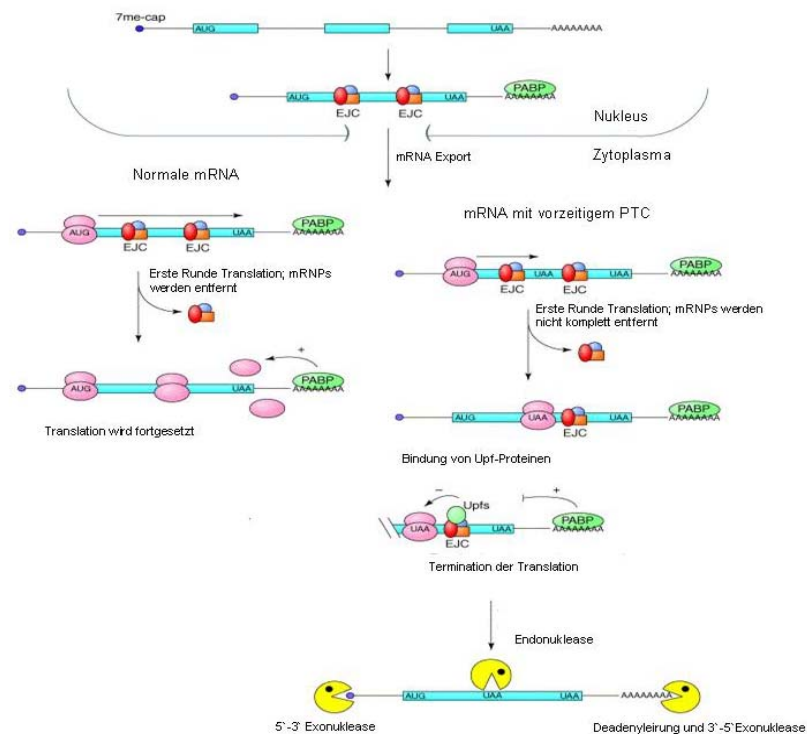


Abbildung 2.9: Nonsense-mediated mRNA decay (NMD). Der Speißvorgang platziert Proteinkomplexe (EJC) 20-22 nt stromaufwärts der Exon-Exon Grenzen. Während der ersten Runde der Translation entfernen die Ribosomen alle EJC von der mRNA und es entsteht ein stabiler Translationskomplex. Können nicht alle EJC entfernt werden, weil die Translation an einem vorzeitigem Stop-Codon (PTC) inhiert wird, führt dies zur Degradation der fehlerhaften mRNA. [Abbildung modifiziert nach *Nonsense-mediated mRNA decay: terminating erroneous gene expression*, Baker and Parker 2004.]

Eine der ersten bekannten genetischen Erkrankungen, bei der NMD durch den Abbau mutierter Transkripte die Ausprägung des Phänotyps beeinflusst, war eine rezessive Variante der β -Thalassämie. Die Krankheit wird durch Mutationen im Gen für β -Globin verursacht. Patienten mit PTCs in den ersten beiden Exons dieses Gens sind klinisch asymptomatisch, und es sind kaum Transkripte vom mutierten Allel nachweisbar [Baserga and Benz 1988]. Dagegen entwickeln Patienten mit PTCs im letzten Exon des β -Globin Gens einen ausgeprägteren Phänotyp, da die Transkripten des mutierten Allels nicht mehr vom NMD erkannt werden können. Es kommt zur Expression trunkierter Proteine, die mit den normalen funktionsfähigen Proteinen des Wildtyp-Allels interferieren.

3 Methoden

3.1 Molekularbiologische Methoden

3.1.1 DNA-Isolation

Zur Isolation genomischer DNA wurden Leukozyten aus 10 ml Vollblut isoliert, in 1 ml Lysispuffer mit 5 µl Proteinase K (100 mg/ml) resuspendiert und 3 h bei 50°C verdaut. Um die Proteine von der DNA zu trennen, wurde die Lösung mit dem gleichen Volumen eines Gemisches aus Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1) versetzt und gründlich gemischt. Ein Zentrifugationsschritt für 15 min bei 1.500 g führte zur Trennung in eine untere organische Phase und eine obere wässrige Phase. Die Proteine sammelten sich in der Interphase. Die obere wässrige Phase mit den gelösten Nukleinsäuren wurde vorsichtig abgenommen und mit einem gleichen Volumen Chloroform gemischt, um Phenolreste zu entfernen. Durch einen erneuten Zentrifugationsschritt für 15 min bei 1.500 g wurde die wässrige und organische Phase abermals getrennt. Die Fällung der DNA erfolgte durch Zugabe von 0,1 Volumen Natriumacetat (3 M; pH 5,2) und zwei Volumen 100 % Ethanol zur oberen wässrigen Phase. Das DNA-Pellet wurde mit 70 % (v/v) Ethanol gewaschen, 10 min bei Raumtemperatur getrocknet und anschließend in H₂O resuspendiert. Die DNA-Lösung wurde bei 4°C, oder für längere Perioden bei -20°C, gelagert.

Lysispuffer	10 mM Tris-Cl, pH 8,0 0,1 M EDTA, pH 8,0 0,5 % (w/v) SDS
-------------	--

3.1.2 RNA-Isolation

Die RNA-Extraktion aus Leukozyten erfolgte mit *peqGOLD RNAPure* (*peqlab*), einer einphasigen Lösung aus Phenol und Guanidinisothiocyanat (GTC). GTC ist ein chaotropes Salz und denaturiert Proteine, während durch Zugabe von Phenol und Chloroform die Proteine und DNA-Fragmente von der RNA getrennt werden.

5 x 10⁶ Zellen wurden in 500 µl *peqGold RNAPure* lysiert und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Zugabe von 100 µl Chloroform und einer anschließenden Zentrifugation für 5 min bei 12.000 g trennte sich das Homogenat in drei Phasen. Die untere Phenol-Chloroform Phase und die Interphase enthielten hauptsächlich Proteine und DNA, während sich die RNA in der oberen wässrigen Phase anreicherte. Nach Überführung der wässrigen Phase in ein frisches Gefäß wurde die RNA durch Zugabe von 250 µl Isopropanol gefällt und in einem Zentrifugationsschritt für 10

min bei 10.000 g präzipitiert. Das RNA-Pellet wurde mit 75 % Ethanol gewaschen, 5 min bei Raumtemperatur getrocknet und in 50 µl RNase freiem Wasser resuspendiert.

3.1.3 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäurelösungen

Konzentrationen von Nukleinsäurelösungen wurden durch Messung der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 260 nm in dem Spektrophotometer UV-1601 (*Shimadzu*) bestimmt. Die Nukleinsäurekonzentration (c) errechnete sich aus der gemessenen OD bei 260 nm (OD_{260}), dem Verdünnungsfaktor (V) und einem spezifischen Multiplikationsfaktor (F) für DNA ($F = 50$) oder RNA ($F = 40$).

$$c [\mu\text{g/ml}] = OD_{260} \times V \times F [\mu\text{g/ml}]$$

Durch eine zusätzliche Bestimmung der OD bei 280 nm erhielt man aus dem Verhältnis der $OD_{260\text{nm}}$ und der $OD_{280\text{nm}}$ eine Aussage über die Verunreinigung der Lösung mit Proteinen. In der Regel weisen proteinfreie Nukleinsäurelösungen ein Verhältnis von 1,8 – 2,0 auf.

3.1.4 Reverse Transkription

Die Reverse Transkription ist eine Methode, um von einer RNA cDNA-Kopien herzustellen. Dabei hybridisiert zuerst ein Primer an die RNA, den anschließend eine RNA-abhängigen DNA-Polymerase verlängert. In der Regel werden Oligo-dT- oder *Random*-Hexamer-Primer verwendet. Oligo-dT-Primer binden selektiv an die Poly-A-Schwänze von mRNA, während die zufälligen Hexamer-Primer irgendwo an die RNA hybridisieren.

Für die die cDNA-Synthese wurden 2 µg Gesamt-RNA mit 1 µl Hexamer-Primern (50 ng/µl) und 1 µl dNTPs (10 mM each) gemischt und für 5 min bei 65°C denaturiert. Anschließend wurden 4 µl 5 x RT-Puffer (*Invitrogen*), 1 µl 0,1 M DTT, 1 µl SuperScript III Reverse-Transkriptase (200 U/µl) (*Invitrogen*) und 1 µl RNase-Inhibitor *RNaseOUT* (40 U/µl) (*Invitrogen*) dazu pipettiert und die Reaktion 10 min bei 25°C inkubiert, um eine Anlagerung der Primer an die RNA zu ermöglichen. Die Synthese der cDNA erfolgte bei 50°C für 60 min. Die Reverse-Transkriptase wurde durch eine Erwärmung der Reaktion auf 70°C für 15 min inaktiviert.

5 x RT-Puffer 250 mM Tris-HCl, pH 8,3
 375 mM KCl
 15 mM MgCl₂

3.1.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist es möglich, selektiv eine DNA-Sequenz spezifischer Länge *in vitro* zu amplifizieren. Die Verwendung einer *Hotstart*-Polymerase ermöglicht es, die Anzahl unspezifischer Artefakte zu verringern. Die *Hotstart*-Polymerase ist mit einem Antikörper gekoppelt, der die Polymeraseaktivität inhibiert. Beim Erhitzen der Reaktion für 15 min auf 95°C denaturiert der Antikörper und dissoziiert von der Polymerase. Dies garantiert, dass die Polymerase erst bei einer ausreichend hohen Temperatur aktiv wird, bei der die Primer spezifisch an die DNA binden.

Ein typisches PCR-Programm, das in einem Thermocycler (*Biometra*) durchgeführt wurde, bestand aus einer initialen Aktivierung der *Hotstart*-Polymerase für 15 min bei 95°C. Es folgten 35 Zyklen, bestehend aus jeweils einem Denaturierungsschritt, einem Annealingschritt und einem Elongationsschritt, gefolgt von einem letzten Elongationsschritt für 10 min bei 72°C. Die Annealingtemperatur variierte je nach den verwendeten Primern zwischen 62°C und 55°C. Um eine höhere Spezifität der Reaktion zu garantieren, wurde in einigen Fällen auch eine *Touch-Down*-PCR angewendet. Dabei wurde die Annealingtemperatur, ausgehend von einer hohen Temperatur in den ersten 10 Zyklen schrittweise (1°C / 2 Zyklen) gesenkt. Bei der *Touch-Down*-PCR werden in den ersten Zyklen weniger PCR-Produkte gebildet, dafür binden die Primer aber mit einer höheren Spezifität. Die Elongationszeit (1 min pro 1 kb) wurde an die Länge des zu erwartenden PCR-Produktes angepasst.

PCR-Ansatz (20 µl):

1 x PCR-Puffer BD
 2,5 mM MgCl₂
 4 pmol je Primer
 4 nmol dNTPs (*Fermentas*)
 6 % (v/v) DMSO
 80 ng genomische DNA
 1 U HotFire DNA-Polymerase (*Solis Biodyne*)

PCR-Programm

1. Aktivierung	95°C 15 min
2. Denaturierung	95°C 30 sek
3. Annealing	60°C 30 sek
4. Elongation	72°C 1 min/kb
	35 Zyklen: Schritt 2 – 4
5. Elongation	72°C 10 min

Primer für die Amplifikation der entsprechenden DNA-Sequenzen wurden unter Verwendung der *Primer3*-Software des *Whitehead Instituts*¹ ausgewählt. Dabei wurde auf folgende Parameter geachtet: die Primerlänge betrug normalerweise 18 - 25 bp, die Primer sollten nicht mehr als vier gleiche Basen hintereinander enthalten und die Länge des PCR-Produktes nicht größer als 600 bp sein, die Schmelztemperatur der Primer sollte um 60°C liegen, um eine ausreichend hohe Annealingtemperatur zu ermöglichen und die Primer durften nicht miteinander hybridisieren können und keine intramolekularen Haarnadelstrukturen bilden.

¹ <http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3.cgi>

10 x PCR-Puffer BD	800 mM Tris-HCl 200 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ pH 9,4 – 9,5
--------------------	---

3.1.6 Real-Time-PCR

Die *Real-Time*-PCR ermöglicht eine Quantifizierung der in einer Probe enthaltenen Transkripte eines Gens. Für eine *Real-Time*-PCR werden zwei Primer und eine dazwischenliegende Sonde benötigt, die spezifisch mit der gesuchten cDNA-Sequenz hybridisieren. Die Sonde ist am 5'-Ende mit einem Fluoreszenzfarbstoff und am 3'-Ende mit einem Quencher markiert, der durch die räumliche Nähe die Lichtemission des Fluoreszenzfarbstoffes unterdrückt. Die 5'-Nukleaseaktivität der DNA-Polymerase führt zu einer Spaltung der Sonde und bewirkt damit die Trennung von Farbstoff und Quencher. Die resultierende Zunahme der Fluoreszenz wird detektiert und ist proportional zum gebildeten Produkt und erlaubt die Berechnung der relativen Menge der in der Probe vorhandenen cDNA.

Die *Real-Time*-PCR wurde mit Hilfe des *LightCycler*[®] 2.0 Systems (Roche) durchgeführt. Für jede Probe wurde die Reaktion im Triplettsystem angesetzt und der Mittelwert zur Berechnung der cDNA-Menge herangezogen.

Reaktionsansatz (20 µl):

1 x Detektionsmix (beinhaltet Primer + Sonde)
4 mM MgCl₂
100 ng cDNA
5 U FastStart Taq DNA-Polymerase (Roche)

LightCycler-Programm

1. Aktivierung	95°C 10 min
2. Denaturierung	95°C 15 sek
3. Annealing	54°C 15 sek
4. Elongation	72°C 15 sek
45 Zyklen: Schritt 2 - 4	

Für die Quantifizierung der cDNA wurde die Fluoreszenz gegen die Zyklenzahl aufgetragen. Zu Beginn der exponentiellen Phase überschreitet die Fluoreszenz einen festgelegten Detektionsschwellenwert. Der Zyklus, in dem dieser Wert erreicht wurde, war der Schwellenwertzyklus (C_t). Die Normalisierung der Transkripte des Gens LMNA (Hs01108897, *Applied Biosystems*) erfolgte gegen das ubiquitär exprimierte Kontrollgen ALAS1 (d-Aminolevulinat Synthase, Artnr.: 3302504, *Roche*) nach folgender Formel:

$$\text{Relative LMNA-Expression} = \text{LMNA} : \text{ALAS1} = 2^{\text{Ct(ALAS1)} - \text{Ct(LMNA)}}$$

Auf diese Weise ließ sich die cDNA-Menge des LMNA-Gens in den Patientenproben direkt mit den Kontrollen vergleichen.

3.1.7 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese ermöglicht eine schnelle Trennung von DNA-Fragmenten und die Bestimmung ihrer Größe sowie deren Quantifizierung.

Für das Gel wurde Standard-Agarose (*Sigma*) in 1 x TAE-Puffer aufgekocht und Ethidiumbromid (Endkonzentration 0,5 µg/ml) zugegeben. Je nach zu erwartenden Fragmentgrößen wurden Agarosekonzentrationen zwischen 0,8 % für größere Fragmente (> 1 kb) und 2 % für kleinere Fragmente (~ 100 bp) verwendet. Die Proben wurden mit $\frac{1}{6}$ Volumen Ladepuffer versetzt. Der Ladepuffer erhöhte die Dichte der Proben und diente der Kontrolle des Laufverhaltens der Proben. Als Größenstandard und zur Bestimmung von DNA-Konzentrationen wurde der 100 bp- oder 1 kb-Marker von *Fermentas* verwendet. Die Elektrophorese erfolgte bei einer Spannung von 100 Volt in einer *MINI-SUB*-Elektrophoresekammer von *BioRad*. Die Gele wurden unter UV-Licht mit dem *GelJet Imager* (*INTAS, Göttingen*) dokumentiert.

6 x Ladepuffer	0,25 % Bromphenol Blau 0,25 % Xylen-Cyanol FF 15 % Ficoll in Wasser	50 x TAE	2 M Tris-Acetat 0,05 M EDTA auf pH 8,0 mit NaOH
100 bp DNA Marker:	3000bp, 2000bp, 1500bp, 1200bp, 1000bp, 900bp, 800bp, 700bp, 600bp, 500bp, 400bp, 300bp, 200bp, 100bp	1 kb DNA Marker	10.000bp, 8000bp, 6000bp, 5000bp, 4000bp, 3500bp, 3000bp, 2500bp, 2000bp, 1500bp, 1000bp, 750bp, 500bp, 250bp

3.1.8 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

DNA-Fragmente wurden mit Anionen-Austauscher-Säulen (*Qiagen Gel Extraction Kit*) aus Agarosegelen isoliert. Die DNA bindet dabei in Gegenwart hoher Salzkonzentrationen an eine Silikat-Membran, während Agarosereste und andere Verunreinigungen ausgewaschen werden.

Das gewünschte DNA-Fragment wurde aus dem Agarosegel ausgeschnitten und in einem 3-fachen Volumen Hochsalzpuffer *QG* bei 50°C vollständig gelöst. Anschließend wurde die Suspension auf eine Säule mit Silikat-Membran pipettiert. Die DNA bindet an die Säule, während Verunreinigungen durch Zentrifugation für 1 min bei 12.000 g entfernt werden konnten. Nach einem Waschschritt mit 750 µl PE-Puffer wurde die DNA mit 30 µl H₂O von der Membran eluiert.

QG-Puffer	6M Guanidinthiocyanat
-----------	-----------------------

3.1.9 DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung erfolgte nach der *Cycle-Sequencing*-Methode, einer Weiterentwicklung der enzymatischen Didesoxy-Methode von Sanger et al. (1977). Dabei synthetisierte eine DNA-Polymerase anhand von DNA-Matrizen (PCR-Produkte) in einer zyklischen, enzymatischen Reaktion DNA-Fragmente. Zusätzlich zu den normalen Desoxynukleotiden (dNTP) enthält die Reaktion aber noch Didesoxynukleotide (ddNTP). Der Einbau eines ddNTP während der Elongation, verhindert die Ausbildung einer weiteren Phosphodiesterbindung und führt zu einem vorzeitigen Abbruch der Elongationsreaktion. Durch einen Überschuss an dNTPs gegenüber ddNTPs im Reaktionsansatz treten die Kettenabbrüche statistisch gesehen an jeder möglichen Basenposition in der Sequenz auf. So entstehen DNA-Fragmente jeder Länge, die jeweils mit der Primersequenz beginnen und mit einem ddNTP enden. In dem verwendeten Reaktionskit sind die ddNTPs entsprechend ihrer Basen mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen gekoppelt, die nach Anregung durch einen Laser detektiert werden können.

Die Sequenzierreaktion erfolgte mit dem *BigDye Terminator Mix 3.1* nach dem entsprechenden Protokoll von *Applied Biosystems* in einem Thermocycler (*Biometra*).

Sequenzierreaktion (20 µl):	Sequenzierprogramm	
1 x Sequenzierpuffer (ABI)	1. Denaturierung	96°C 10 sek
0,5 µl BigDye 3.1 Terminator Mix (ABI)	2. Annealing	50°C 5 sek
5 pmol Primer	3. Elongation	60°C 4 min
400 ng Plasmid oder		27 Zyklen Schritt 1 – 3
40 ng aufgereinigtes PCR-Produkt		

Die Produkte der Sequenzierreaktion wurden durch Zugabe von $\frac{1}{10}$ Volumen Natriumacetat (3 M; pH 5,2) und zwei Volumen Ethanol (100 %) gefällt und anschließend in einem Zentrifugationsschritt für 30 min bei 13.000 g und 4°C präzipitiert. Das entstandene Pellet wurde mit 70 % (v/v) Ethanol gewaschen, erneut für 10 min bei 13.000 g abzentrifugiert und abschließend für 5 min in einer Vakuumzentrifuge getrocknet.

Für die Auftrennung und Analyse der DNA-Fragmente mit dem *DNA Sequenzer 377* (*Applied Biosystems*) wurde das Pellet in 2 µl Probenpuffer resuspendiert und in die Geltaschen pipettiert. Die Auftrennung erfolgte elektrophoretisch in einem 6 %igen Polyacrylamidgel (Herstellung des Gel siehe Kapitel 3.2.2).

Erfolgte die Auftrennung und Analyse der DNA-Fragmente mit dem Kapillarsequenzer *Genetic Analyzer 3130* (*Applied Biosystems*), wurde das Pellet in 10 µl *HiDi Formamid* (*Applied Biosystems*) resuspendiert. Bei der Kapillar-Elektrophorese diente das Polymer POP7 (*Applied Biosystems*) als Trennmedium. Die im Formamid aufgenommene DNA wurde durch elektrostatische

Wechselwirkungen in die Kapillaren injiziert und elektrophoretisch aufgetrennt. Die fluoreszenzmarkierten DNA-Fragmente wurden am Ende der Kapillare angeregt, das emittierte Licht von einer CCD-Kamera registriert und die Daten mit Hilfe der *Sequencing Analysis Software v5.0 (Applied Biosystems)* analysiert und ausgewertet.

Probenpuffer (377):	5 Volumen	Formamid
	1 Volumen	25 mM EDTA (pH 8,0)
		50 mg/ml Dextranblau

3.1.10 Mutationsanalyse von Kandidatengen

Die innerhalb der Kandidatenregion liegenden Gene und ihre Exon-Intron Struktur wurden der humanen Referenzsequenz des *International Human Sequencing Consortium* (NCBI Build 35, May 2004) entnommen. Zur Mutationanalyse wurden die proteinkodierenden Exons der Kandidatengene sowie wenigstens 50 bp der flankierenden Introns sequenziert. Primer für die Amplifikation der entsprechenden DNA-Sequenzen wurden unter Verwendung der *Primer3*-Software des *Whitehead Instituts*² ausgewählt. Dabei wurde auf folgende Parameter geachtet: die Primerlänge betrug normalerweise 18 - 25 bp, die Primer sollten nicht mehr als vier gleiche Basen hintereinander enthalten und die Länge des PCR-Produktes nicht größer als 600 bp sein, die Schmelztemperatur der Primer sollte um 60°C liegen, um eine ausreichend hohe Annealingtemperatur zu ermöglichen und die Primer durften nicht miteinander hybridisieren können und keine intramolekularen Haarnadelstrukturen bilden. Die PCR-Amplifikation der proteinkodierenden Exons erfolgte in einer 20 µl-Reaktion. Überschüssige Primer und dNTPs wurden anschließend durch einen Verdau der PCR-Reaktion mit einer Mischung aus 0,2 Units Exonuklease (*New England Biolabs*) und 0,4 Units alkalischer Phosphatase (*Shrimp Alkaline Phosphatase, GE Healthcare*) für 30 min bei 37°C entfernt. Nach der Inaktivierung der Enzyme für 15 min bei 80°C erfolgte die Sequenzierreaktion.

3.1.11 Restriktionsverdau

Restriktionsendonukleasen haben die Fähigkeit, doppelsträngige DNA an spezifischen Stellen zu schneiden. Die Aktivität von Restriktionsendonukleasen wird in Units angegeben. Eine Unit (1 U) entspricht der Enzymmenge, die benötigt wird, um 1 µg *Lambda*-DNA in 1 h zu verdauen.

² <http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3.cgi>

Eine Restriktionsanalyse erfolgte nach folgendem Reaktionsansatz:

1 µg Plasmid DNA
1 x Reaktionspuffer
5 U Enzym
mit H₂O auf 30 µl auffüllen

Puffer und Enzyme wurden von *New England Biolabs* oder *Fermentas* bezogen. Je nach Enzym wurde der empfohlene Puffer gewählt und die Reaktion bei 37°C für 1 h im Thermoblock inkubiert. Wenn angezeigt, wurde dem Verdau BSA (*Bovine Serum Albumin*) zugesetzt. Bei einem Verdau mit zwei Enzymen wurde ein Puffer verwendet, in dem beide Enzyme mindestens eine Aktivität von 75 % besitzen. Fand sich kein geeigneter Puffer, wurde die Plasmid-DNA nach dem ersten Verdau mit einer Natriumacetat/Ethanol-Fällung präzipitiert, bevor mit dem zweiten Enzym verdaut wurde. Für den Verdau von PCR-Fragmenten wurde das Enzym mit dem entsprechenden Puffer einfach zu dem fertigen Reaktionsansatz gegeben und für 1 h bei 37°C im Thermoblock inkubiert. Die Analyse der Restriktionsfragmente erfolgte elektrophoretisch auf einem Agarosegel.

3.1.12 Dephosphorylierung der 5'-Enden von DNA

Endständige 5'-Phosphatgruppen eines linearen doppelsträngigen DNA-Moleküls wurden durch Dephosphorylierung entfernt. Durch die Dephosphorylierung eines Vektors kann die Religation des geschnittenen Vektors ohne Aufnahme des gewünschten Inserts verhindert werden.

Dazu wurde das mit Restriktionsendonukleasen geschnittene Plasmid mit 1 Unit alkalischer Phosphatase (*Shrimp Alkaline Phosphatase, GE Healthcare*) für 1 h bei 37°C inkubiert. Die Phosphatase wurde durch eine Hitzeinaktivierung für 15 min bei 85°C inaktiviert. Die Plasmid-DNA wurde durch eine Natriumacetat/Ethanol-Fällung aufgereinigt.

3.1.13 Ligation von DNA-Fragmenten

Das Standardenzym für die Ligation von DNA-Fragmenten in einen Vektor ist die T4-DNA Ligase. Die Ligase katalysiert unter ATP-Verbrauch die Ausbildung einer Phosphodiesterbindung zwischen einer 5'-Phosphatgruppe und einer 3'-OH-Gruppe.

Ligationsansatz 1 x Ligationspuffer
 200 U T4-DNA-Ligase (*Invitrogen*)
 25 ng Vektor-DNA
 DNA-Fragment (5 fache molare Masse der Vektor-DNA)

Der Ansatz wurde über Nacht bei 16°C inkubiert.

Standardmäßig wurde für eine Ligation molar fünfmal mehr DNA-Fragment als Vektor-DNA eingesetzt. Wurden 25 ng Vektor-DNA verwendet, errechnete sich die Menge an benötigtem Insert aus folgender Formel:

$$\text{Masse}_{\text{DNA-Fragment}} [\text{ng}] = (5 \times 25 \text{ ng}) \times \text{Länge}_{\text{Fragment}} [\text{bp}] / \text{Größe}_{\text{Vektor}} [\text{bp}]$$

5 x Ligationspuffer	250 mM Tris-HCl (pH 7,6)
	50 mM MgCl ₂
	5 mM ATP
	5 mM DTT
	25 % (w/v) Polyethylenglykol

3.1.14 Herstellung chemisch kompetenter Bakterien

Um *E.coli*-Bakterien (DH5 α) transformationskompetent zu machen, wurde die Calciumchlorid-Methode verwendet. Dazu wurden 100 ml LB-Medium in einem Erlenmeyerkolben mit einer Einzelkolonie angeimpft und bei 37°C in einem Schüttler inkubiert. Die Kultur wurde inkubiert, bis sie eine OD_{600nm} von 0,5 erreicht hatte. Anschließend wurden die Bakterien bei 3.000 g für 10 min abzentrifugiert, in 10 ml kalter CaCl₂-Lösung (60 mM) resuspendiert und erneut bei 3.000 g für 10 min pelletiert. Das Pellet wurde in 2 ml CaCl₂-Lösung + 20 % Glycerin aufgenommen, aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

LB-Medium	1 % (w/v) Trypton
	0,5 % (w/v) Hefeextrakt
	0,5 % (w/v) NaCl

3.1.15 Bakterientransformation

Für die Transformation wurden 25 μ l chemisch kompetente *E.coli*-Bakterien (DH5 α) mit 2 μ l eines Ligationsansatzes (siehe Kapitel 3.1.13) gemischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Danach wurde der Transformationsansatz für 45 Sekunden auf 42°C gestellt und noch mal 1 min auf Eis inkubiert, bevor der Ansatz mit 250 μ l vorgewärmtem SOC-Medium vorsichtig gemischt und für 1 h bei 37°C inkubiert wurde. Anschließend konnte die Bakteriensuspension auf selektiven LB-Platten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausgestrichen werden. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert.

LB-Agar	1 % (w/v) Trypton 0,5 % (w/v) Hefeextrakt 0,5 % (w/v) NaCl 1,5 % (w/v) Agar	SOC-Medium	2 % (w/v) Trypton 0,5 % (w/v) Hefeextrakt 0,5 % (w/v) NaCl 2,5 mM KCl 10 mM MgCl ₂ 20 mM Glucose auf pH 7,0 einstellen
---------	--	------------	---

Antibiotikum	Arbeitskonzentration	Stocklösung
Ampicillin	50 µg/ml	50 mg/ml in H ₂ O
Kanamycin	50 µg/ml	50 mg/ml in H ₂ O

3.1.16 Präparation von Plasmid-DNA

Die Anzucht größerer Mengen Bakterien aus einer Einzelkolonie erfolgte in Flüssigkulturen mit LB-Medium und dem entsprechenden Antibiotikum. Für Minipräparationen wurden 5 ml Bakterienkultur und für Midipräparationen 30 ml Bakterienkultur verwendet. Die Kulturen wurden über Nacht bei 37°C in einem Schüttler inkubiert.

Die Isolation der Plasmid-DNA erfolgte entweder mit dem *QIAPrep Spin Miniprep Kit* oder dem *Plasmid Midi Kit* von *Qiagen*. Nach der Lyse der Bakterienzellen beruhte das Prinzip der Aufreinigung auf einer alkalischen Denaturierung der chromosomalen DNA und der anschließenden Bindung der Plasmid-DNA an eine Anionenaustauschersäule. Proteine und andere Verunreinigungen wurden durch eine Lösung mit mittlerer Salzkonzentration ausgewaschen. Zum Schluss kann die Plasmid-DNA dann durch eine Lösung mit hoher Salzkonzentration von der Säule eluiert werden.

Für eine Midipräparation wurden die Bakterien einer 30 ml Übernachtskultur durch einen Zentrifugationsschritt für 10 min bei 6.000 g pelletiert und anschließend in 4 ml P1 Puffer lysiert. Nach der Zugabe von 4 ml Alkali-Puffer P2 wurde der Ansatz vorsichtig gemischt und für 3 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Lösung wurde durch Zugabe von 4 ml Puffer P3 neutralisiert. Die ausgefallenen Zelltrümmer, die chromosomale DNA und Proteine sowie SDS wurden durch einen Zentrifugationsschritt für 30 min bei 20.000 g präzipitiert. Der Überstand, der die Plasmid-DNA enthielt, wurde abgenommen und auf eine vorher mit 4 ml QBT äquilibrierte *Qiagen-tip100*-Säule geladen. Der Puffer floss durch die Gravitationskraft selbstständig ab. Anschließend wurde die Säule zweimal mit 10 ml QC-Puffer gewaschen. Die Elution der Plasmid-DNA erfolgte mit 5 ml QF-Puffer. Durch Zugabe von 3,5 ml Isopropanol zu dem Eluat wurde die DNA gefällt und in einem Zentrifugationsschritt für 30 min bei 15.000 g bei 4°C präzipitiert. Das Plasmid-Pellet wurde einmal mit 2 ml 70 % (v/v) Ethanol gewaschen, 5 min bei Raumtemperatur getrocknet und anschließend in 100 µl Wasser resuspendiert.

Puffer P1	50 mM Tris-HCl, pH 7,8 10 mM EDTA, pH 8,0 100 µg/ml RNase A	Puffer QBT	750 mM NaCl 50 mM MOPS, pH 7,0 15 % (v/v) Isopropanol 0,15 % (v/v) Triton-X-100
Puffer P2	200 mM NaOH 1 % (w/v) SDS	Puffer QC	1 M NaCl 50 mM MOPS, pH 7,0 15 % (v/v) Isopropanol
Puffer P3	3 M Kaliumacetat, pH 5,5	Puffer QF	1,25 M NaCl 50 mM Tris-HCl, pH 8,5 15 % (v/v) Isopropanol

3.2 Kopplungsanalyse (*Linkage Analysis*)

3.2.1 Mikrosatellitenmarker

Das Ziel der Kopplungsanalyse ist die Kartierung eines Gens, das mit einem speziellen phänotypischen Merkmal in einer Familie segregiert. Für die Kopplungsanalyse wurden die Mikrosatellitenmarker des CHLC/Weber-Screeningsets (10. Version)³ verwendet (*ResGen, Invitrogen Corporation*). Die 405 Mikrosatellitenmarker waren gleichmäßig über das gesamte nukleäre Genom verteilt, mit einem durchschnittlichen Abstand von 9 cM. Von den Markern hatten 88 % Tri- oder Tetranukleotid-Wiederholungseinheiten mit einer durchschnittlichen Heterozygotie von 74 %. Von den Primerpaaren für die Mikrosatelliten-Marker war jeweils ein Primer am 5'-Ende mit einem von drei verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen (FAM, TET, HEX) gekoppelt.

Die Position der verwendeten Mikrosatellitenmarker basierte auf genetischen Karten von *Marshfield*⁴ [Broman et al. 1998] oder *DeCode Genetics* [Kong et al. 2002].

3.2.2 Genotypisierung

Die Amplifikation der Mikrosatelliten-DNA erfolgte mittels *Touch-Down-PCR* in 10 µl-Reaktionen. Abhängig von ihrer Größe und Fluoreszenzmarkierung konnten die PCR-Produkte in Panel aufgeteilt werden, was es ermöglichte, mehrere Marker eines Probanden auf einer Spur des Sequenziergels zu analysieren. Dazu wurden je 2 µl der entsprechenden PCR-Reaktionen gemischt.

³ <ftp://ftp.resgen.com/pub/mappairs/humanset/Version10.txt>

⁴ <http://research.marshfieldclinic.org/genetics/GeneticResearch/compMaps.asp>

Von diesem Gemisch wurden wiederum 0,6 µl mit 1,5 µl des Größenstandards TAMRA-500 (*Applied Biosystems*) zusammen pipettiert und für 3 min bei 95°C denaturiert. Von diesen Proben wurden 0,3 µl auf einen Papierkamm (*MWG Biotech AG*) aufgetragen.

Die Bestimmung der Allellängen der Mikrosatelliten erfolgte auf einem 6 %igen denaturierenden Polyacrylamidgel. Zur Herstellung des Gels wurde eine Monomerlösung, die Acrylamid und Bisacrylamid enthielt, und eine Pufferlösung, bestehend aus TBE-Puffer und TEMED, im Verhältnis 4:1 gemischt und 0,08 % Ammoniumperoxidsulfat (APS, *AppliChem*) als Polymerisationskatalysator zugesetzt. Die Gellösung wurde zwischen zwei sorgfältig mit Detergenz (*Alconox*) gesäuberte Glasplatten mit Abstandhalter gegossen. Nach dem Polymerisieren wurde das Gel in den *ABI Prism 377 Genetic Analyzer* gespannt, die Pufferkammern mit 1 x TBE-Puffer befüllt und der Probenkamm vorsichtig auf die obere Kante des Gels gesetzt.

Die fluoreszenzmarkierten PCR-Produkte wurden entsprechend ihrer Länge per Elektrophorese aufgetrennt, am Ende des Gels durch einen Laser angeregt und das emittierte Licht mit einer CCD-Kamera (*charged-coupled devise camera*) detektiert. Aus den Daten errechnete die Analyse-Software (*GeneScan Analysis*) im Vergleich zu dem mitgelaufenen Größenstandard die Länge der jeweiligen Markerallele und die *Genotyper-Software* erstellte daraus für jeden Marker Elektropherogramme, aus denen die entsprechenden Genotypen für die Probanden ersichtlich waren.

TAMRA-500	70 % (v/v) Formamid 15 % (v/v) GENE SCAN-Puffer 15 % (v/v) GENE-SCAN-500	10 x TBE	0,89 M TRIS-Base 0,89 M Borsäure 0,02 M EDTA pH-Wert 8,3
6 % Polyacrylamidgel	80 % (v/v) Pufferlösung <i>SequagelIXR (National Diagnostic)</i> – enthält Harnstoff Acrylamid und N'N'-Methylen-Bisacrylamid 20 % (v/v) Pufferlösung <i>Sequagel Complete Buffer Reagent (National Diagnostic)</i> – enthält TBE und TEMED 0,08 % (w/v) APS		

3.2.3 LOD-Score Berechnung

Bei der Zweipunkt LOD-Score Berechnung wird die Wahrscheinlichkeit berechnet, dass zwei Loci miteinander gekoppelt vererbt werden [$L(\theta)$] oder die Wahrscheinlichkeit, dass keine Kopplung besteht [$L(0,5)$]. Das Verhältnis dieser beiden Wahrscheinlichkeiten drückt die Chance für eine Kopplung aus (*odds of linkage*). Der Wert dieses Quotienten, gewöhnlich als Logarithmus angegeben, wird als LOD-Score Z (*logarithm of the odds*) bezeichnet. Dabei sind die LOD-Werte eine Funktion der Rekombinationsfraktion θ und werden für mehrere Werte (zwischen 0 und 0,5) von θ berechnet. Die Signifikanzschwelle für eine Kopplung liegt für

$$Z(\theta) = \log_{10} \frac{L(\theta)}{L(0,5)}$$

bei $Z > 3,0$. Ein Lod-Score $Z < -2,0$ schließt eine Kopplung aus.

Für die parametrische Zweipunkt LOD-Score Berechnung wurde ein genaues genetisches Modell benötigt, in dem Vererbungsmodus, Genhäufigkeit und Penetranz eines jeden Genotyps enthalten waren. Aufgrund der klinischen Daten und der Stammbaumanalyse haben wir für die LOD-Score Berechnung einen autosomal-dominanten Erbgang zu Grunde gelegt. Außerdem sind wir von einer Allelfrequenz des Krankheitsgens von 0,1 % und eine Gleichverteilung der Allelfrequenzen der einzelnen Mikrosatellitenmarker ausgegangen. Aufgrund der altersabhängigen Penetranz haben wir nur die Patienten mit einer gesicherten DCM-Diagnose bei der Berechnung des LOD-Scores als *affected* eingestuft. Alle anderen Familienmitglieder haben wir als *unknown* klassifiziert. Daher konnten wir bei unseren Berechnungen eine Penetranz von 100 % annehmen („*affected-only*“-Methode). Das Auftreten von Phänokopien wurde ausgeschlossen.

Die statistische Auswertung der Genotypen erfolgte durch eine parametrische Zweipunkt LOD-Score Berechnung [Terwilliger, Ott 1994] mittels des Moduls FASTLINKv4.1 [Cottingham et al. 1993], welches in der LINKAGEv2.10 Software [Lindner, Hoffmann 2005] implementiert ist. Informationen über den Stammbaum wurden dabei in einer Datei (*Pedfile*) angelegt, in der für jedes Individuum folgende Informationen gespeichert waren: ID-Nummer, ID-Nummern beider Elternteile, das Geschlecht, der Krankheitsstatus und der Markergenotyp. Das FASTLINK-Modul enthielt u.a. die Programme MLINK und UNKNOWN. Das Programm UNKNOWN identifizierte widersprüchliche Markergenotypen, die keinem mendelschen Erbgang folgten. Das MLINK-Programm berechnete die Zweipunkt LOD-Scores auf der Basis variierender Rekombinationsfraktionen ($\theta = 0; 0,001; 0,01; 0,05; 0,1; 0,15; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5$).

3.3 Proteinbiochemische Methoden

3.3.1 Gesamtzellextrakt

Die konfluent gewachsenen eukaryontischen Zellen wurden mit PBS gewaschen, mit einem Zellschaber abgelöst und durch Zentrifugation bei 1.000 g für 10 min pelletiert. Das Pellet wurde in einem dreifachen Volumen hypotonem Puffer aufgenommen. Das Aufbrechen der Zellen wurde

durch drei Zyklen Einfrieren auf -80°C und anschließendes Wiederauftauen erreicht. Grobe Zelltrümmer wurden durch eine Zentrifugation bei 1.000 g für 3 min entfernt.

Hypotoner Puffer	10 mM HEPES 10 mM KCl 15 mM EDTA 200 mM Sucrose	PBS	2 mM KCl 1,5 mM KH_2PO_4 8 mM Na_2HPO_4 135 mM M NaCl
------------------	--	-----	--

3.3.2 Isolierung von Mitochondrien

Die Isolierung von Mitochondrien aus kultivierten eukaryontischen Zellen erfolgte mit einer Differentialzentrifugation nach dem Protokoll von Attardi und Ching [1979] und Rice und Lindsay [1997].

Die konfluent gewachsenen Zellen wurden mit PBS gewaschen, bevor sie mit einem Zellschaber geerntet und durch eine Zentrifugation bei 300 g für 10 min pelletiert wurden. Der Überstand wurde verworfen, während das Zellpellet in einem 6-fachen Volumen Homogenisierungs-Puffer (CHM-Puffer) resuspendiert wurde. Die im Puffer enthaltenen Mg^{2+} - und K^{+} -Ionen verhinderten die Zerstörung des Zellkerns sowie die Aggregation einiger zytoplasmatischer Proteine. Das Aufbrechen der Zellen erfolgte mit einem Teflon-Glas-Homogenisator. Anschließend wurde die Suspension vorsichtig mit $\frac{1}{3}$ Volumen CHMS-Puffer gemischt. Das so entstandene Homogenat wurde durch eine Differentialzentrifugation in mehrere Pellets und Überstände geteilt. Im ersten Zentrifugationsschritt bei 800 g für 5 min wurden Zelltrümmer und Zellkerne pelletiert (Pellet P1). Der Überstand (Überstand Ü1) wurde erneut bei 12.000 g für 20 min zentrifugiert. Das so erhaltende Pellet (Pellet P2) enthielt die angereicherten Mitochondrien. Die Mitochondrien wurden je nach weiterer Analyse in verschiedenen Puffern resuspendiert.

Für die spätere Analyse mit SDS-PAGE und Immunfärbung wurden die Mitochondrien in SDS-Probenpuffer resuspendiert. Für den *in vitro* Transport wurden die Mitochondrien in Importpuffer aufgenommen.

CHM	150 mM MgCl_2 10 mM KCl 10 mM Tris-Cl pH auf 6,7 einstellen	CHMS	CHM-Puffer 250 mM Sucrose
3 x Probenpuffer	200 mM Tris-Base; pH 6,7 6 % (w/v) SDS 15 % (v/v) Glycerin 10 (v/v) β -Mercaptoethanol Bromphenolblau	Importpuffer	220 mM Mannitol 70 mM Saccharose 2 mM HEPES-KOH (pH 7,4) 1 mM ATP

3.3.3 Proteinfällung

Die denaturierende Fällung mit Chloroform und Methanol diente der Konzentration von Proteinen aus stark verdünnten Lösungen. Dazu wurden 150 µl Proteinlösung mit 600 µl Methanol und 150 µl Chloroform gemischt. Die Zugabe von 450 µl Wasser und einer anschließenden Zentrifugation bei 12.000 g für 2 min trennte das Gemisch in zwei Phasen. An der Interphase sammelten sich die Proteine. Die obere Phase wurde vorsichtig abgenommen und verworfen. Der verbleibende Rest (untere Phase und Interphase) wurde mit 450 µl Methanol gemischt und die ausgefällten Proteine durch eine Zentrifugation bei 12.000 g für 2 min sedimentiert. Das Proteinpellet wurde für 3 min in der Vakuumzentrifuge getrocknet und anschließend in hypotonem Puffer resuspendiert.

Hypotoner Puffer	10 mM HEPES
	10 mM KCl
	15 mM EDTA
	200 mM Sucrose

3.3.4 Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen

Die Konzentration von Proteinlösungen wurde durch den BCA-Test bestimmt [Smith et al. 1985]. In einer alkalischen Lösung bilden Cu^{2+} -Ionen mit Proteinen und Bicinchonininsäure (BCA) einen violetten Farbkomplex. Zur Bestimmung der Proteinkonzentration in den unbekanntenen Proben wurde eine Eichkurve aus verschiedenen BSA-Konzentrationen erstellt. Für den Test wurden die bei *Pierce* erhältlichen Reagenzien – *BCA Protein Assay Reagenz A und B* – im Verhältnis 50:1 gemischt. Von dieser Farbstoffmischung wurden 200 µl mit 10 µl der Proteinprobe für 30 min bei 37°C inkubiert. Die Messung der Absorption erfolgte bei 595 nm in einem Mikroplatten-Lesegerät von *MWG Biotech*.

3.3.5 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) zur Auftrennung von Proteingemischen erfolgte nach Laemmli. Das negativ geladene Sodiumdodecylsulfat (SDS) wirkt denaturierend auf die Proteine und wird von den Proteinen mit einem konstanten Verhältnis von 1,4 Gramm SDS pro Gramm Protein gebunden. Die entstehenden Komplexe unterscheiden sich dadurch nur noch in ihrer Größe und können nach ihrem Molekulargewicht in einem Polyacrylamidgel aufgetrennt werden. Durch unterschiedliche Konzentrationen von Acrylamid und Bisacrylamid kann die Wanderungsgeschwindigkeit der Proteine variiert werden.

Zur Herstellung eines SDS-Polyacrylamidgels wurde zuerst ein 8-12 %iges Trenngel zwischen zwei Glasplatten mit Abstandshalter (1,5 mm) gegossen, bis eine Höhe von ca. 80 % der gesamten Gellänge erreicht war. Das Gel wurde mit Isopropanol überschichtet, um eine ebene Geloberfläche zu erhalten. Nach dem Polymerisieren konnte das Isopropanol abgegossen werden und das Trenngel mit einem Sammelgel überschichtet werden. Das Sammelgel besitzt im Gegensatz zum Trenngel größere Poren und einen anderen pH-Wert, dadurch wandern die Proteine bis zum Erreichen der Grenzfläche zum Trenngel alle auf einer Höhe.

Trenngel (20 ml)	8 %	12%	Sammelgel (5 ml)
30 % Polyacrylamidlösung	5,35 ml	8 ml	0,7 ml 30 % Polyacrylamidlösung
H ₂ O	11,75 ml	9,1 ml	3,4 ml H ₂ O
Puffer B	2,5 ml	2,5 ml	0,65 ml Puffer A
10% SDS	200 µl	200 µl	50 µl 10 % SDS
TEMED	10 µl	10 µl	2,5 µl TEMED
10% APS	200 µl	200 µl	200 µl 10% APS

Vor dem Auftragen wurden die Proteine mit $\frac{1}{3}$ Volumen Probenpuffer versetzt und für 5 min bei 95°C denaturiert. Um die Größe der Proteine abzuschätzen, wurde zusätzlich ein Proteinmarker-gemisch (*SM0671 Fermentas*) auf das Gel aufgetragen. Im Sammelgel erfolgte die Elektrophorese bei 70 Volt und im Trenngel bei 150 Volt.

Puffer A	0,5 M Tris-HCl; pH 6,7	3 x Probenpuffer	200 mM Tris-Base; pH 6,7 6 % (w/v) SDS
Puffer B	3 M Tris-HCl; pH 8,9		15 % (v/v) Glycerin 10 % (v/v) β-Mercaptoethanol Bromphenolblau
10 x Elektrophoresepuffer	240 mM Tris-Base 2 M Glycin 1 % (w/v) SDS	Proteinstandard SM 0671 (<i>Fermentas</i>): 170 kDa, 130 kDa, 100 kDa, 70 kDa, 55 kDa, 40 kDa, 35 kDa, 25 kDa, 15 kDa, 10 kDa	

3.3.6 Western-Blot-Analyse

Für die Immunfärbung wurden die in einem Polyacrylamidgel aufgetrennten Proteine elektrophoretisch auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Die Proteinübertragung erfolgte mit einem Elektrobloetter (*Biometra*) nach der Methode des „Halb-Trocken-Blottens“. Dazu wurden zwei Lagen mit Transferpuffer äquilibriertes *Whatman*-Filterpapier (Dicke 1,2 mm) auf der Anode platziert. Auf das Filterpapier wurden nacheinander die mit Transferpuffer benetzte Membran und das Proteingel gelegt. Abschließend wurden wiederum zwei Lagen feuchtes Filterpapier auf das Gel gelegt. Der Proteintransfer erfolgte für 30 min bei 5 mA / cm².

Der Transfer wurde durch eine Färbung der Membran mit dem Farbstoff PonceauS kontrolliert. Dazu wurde die Membran 2 - 3 Minuten in PonceauS-Lösung inkubiert. Der überschüssige Farbstoff wurde mit Wasser abgewaschen. Da die Färbung reversibel war, konnte sie nach der Dokumentation des Transfers durch mehrmaliges waschen mit TBS wieder entfernt werden.

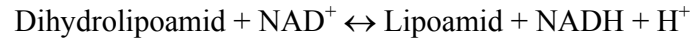
Für den Nachweis von Proteinen mit Antikörpern wurde die Membran zunächst für 1 h in Blockmedium (TBS + 3 % (w/v) Milchpulver) inkubiert, um die Proteinbindungsstellen der Membran abzusättigen. Anschließend wurde die Membran dreimal für jeweils 10 min mit TBS-T gewaschen, bevor sie mit dem 1. Antikörper (verdünnt in TBS-T + 3% (w/v) Milchpulver) über Nacht bei 4°C oder 1 h bei Raumtemperatur inkubiert wurde. Der 1. Antikörper erkannte das gesuchte Protein (Antigen). Ungebundene Antikörper wurden durch 3 x 10 min waschen mit TBS-T entfernt und der Blot danach mit dem 2. Antikörper (verdünnt in TBS-T + 3 % (w/v) Milchpulver) für 1 h inkubiert. Der 2. Antikörper band spezifisch an den ersten und war mit Peroxidase markiert. Nach einem weiteren Waschschrift mit TBS-T erfolgte die Auswertung des Blots mit der ECL-Methode (*Enhanced Chemical Luminescence-Detektionssystem, Amersham*). Gemäß den Herstellerangaben wurden die Reagenzien 1 und 2 zu gleichen Teilen gemischt und auf die Nitrozellulosemembran gegeben. Dabei katalysierte die an den 2. Antikörper gekoppelte Peroxidase die Oxidation von Luminol. Nach 1 min Inkubationszeit wurde die ECL-Lösung wieder von der Membran entfernt. Nach der Oxidation befand sich das Luminol in einem angeregten Zustand und das emittierte Licht konnte über einen Röntgenfilm (*FujiFilm SuperRX*) detektiert werden. Die Entwicklung des Films erfolgte mit dem Kodak-Entwicklungsgerät X-OMAT M35.

Um die Membran mehrmals mit verschiedenen Antikörpern zu färben, mussten die gebundenen Antikörper abgewaschen werden (*strippen*). Dazu wurde der Blot für 1 h bei 50°C in Strip-Puffer inkubiert, nochmals blockiert und konnte dann mit der neuen Antikörperkombination inkubiert werden.

Transferpuffer	25 mM Tris-Base 192 mM Glycin 0,1 % (w/v) SDS	TBS-T	TBS + 0,1 % (v/v) Tween20
PonceauS-Lösung	5 % (v/v) Trichloressigsäure 0,5 % (w/v) PonceauS	Strip-Puffer	3 M Natriumthiocyanat 0,5 % (w/v) β -Mercaptoethanol 0,05 % (v/v) Tween20 pH 9,5
TBS	50 mM Tris-Base pH 8,0 150 mM NaCl		

3.3.7 Bestimmung der Enzymaktivität von Dihydrolipoamid-Dehydrogenase

Die Dihydrolipoamid-Dehydrogenase (EC 1.8.1.4) katalysiert die Oxidation von proteingebundenen Dihydrolipoamid-Gruppen, wobei zwei Elektronen auf NAD^+ übertragen werden.



Die Reduktion von NAD^+ zu NADH kann spektroskopisch gemessen werden als Veränderung der Absorption bei 340 nm.

Für die Messung der Enzymaktivität wurden EBV-transformierte Lymphozyten in hypotonem Puffer resuspendiert. Die Reaktion wurde durch das Mischen von 20 μl Proteinextrakt (2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ Protein) mit 980 μl Assaymix gestartet und die Änderung der Absorption bei 340 nm in einem Spektrophotometer verfolgt. Da bekannt ist, dass das Endprodukt NADH die Dihydrolipoamid-Dehydrogenase inhibiert, wurden nur die ersten 30 Sekunden der Reaktion für die Bestimmung der Enzymaktivität verwendet. Eine deutliche Inhibition der Reaktion trat nach 90 – 120 Sekunden auf.

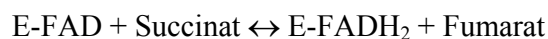
Die Enzymaktivität errechnete sich aus folgender Formel mit einem Extinktionskoeffizienten von $6,3 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$:

$$\text{IU mg}^{-1} = \frac{\Delta A \text{ min}^{-1} \times \text{Verdünnungsfaktor}}{\text{Extinktionskoeffizient} \times \text{Probenvolumen} \times \text{mg Protein ml}^{-1}}$$

Puffer A	5 mM HEPES 1 mM EGTA 210 mM Mannitol 70 mM Sucrose	Hypotoner Puffer	10 mM HEPES 10 mM KCl 15 mM EDTA 200 mM Sucrose
Assay-Mix	3 mM NAD^+ 4 mM Dihydrolipoamid 1,5 mM EDTA in Phosphatpuffer	0,1 M Phosphatpuffer	80 mM K_2HPO_4 20 mM KH_2PO_4 pH 7,4

3.3.8 Bestimmung der Enzymaktivität der Succinat-Dehydrogenase

Die Succinat-Dehydrogenase (EC 1.3.99.1) katalysiert im Zitratzyklus die Oxidation von Succinat zu Fumarat. Als Elektronenakzeptor dient in dieser Reaktion FAD^+ , das kovalent an das Enzym gebunden ist. Die Succinat-Dehydrogenase ist direkt mit der Atmungskette verbunden und kann so die Elektronen von FADH_2 an die Fe-S-Zentren der Enzyme weitergeben.



Für den Enzymassay wurden 300 μl Succinat-Lösung mit 20 μl Proteinextrakt (2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ Protein) für 10 min bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 100 μl p-Iodonitrotetrazolium-

Lösung (INT-Lösung) gestartet, wobei das INT als artifizieller Elektronenakzeptor diente. Nach einer Inkubation von 20 min bei 37°C wurde die Reaktion mit 1 ml Stop-Lösung inhibiert. Die Reduktion von INT konnte spektrophotometrisch bei 490 nm bestimmt werden. Die Berechnung der Enzymaktivität erfolgte nach folgender Formel mit dem Exkinktionskoeffizienten für reduziertes INT: 19,3 M⁻¹ cm⁻¹:

$$\text{IU mg}^{-1} = \frac{\Delta A \times \text{Verdünnungsfaktor}}{\text{Extinktionskoeffizient} \times \text{Probenvolumen} \times \text{mg Protein ml}^{-1}}$$

Phosphatpuffer	50 mM Na ₂ HPO ₄ 50 mM KH ₂ PO ₄	INT-Lösung	Phosphatpuffer + 2,5 mg/ml p-Iodonitrotetrazolium Violet
Succinat-Lösung	10 mM Succinat in Phosphat-Puffer	Stop-Lösung	1 % (w/v) Trichloressigsäure 50 % (v/v) Ethylacetat 50 % (v/v) Ethanol

3.3.9 *In vitro* Transkription und Translation

Für die *in vitro* Synthese radioaktiv markierter Proteine wurde das *TnT Coupled Reticulocyte Lysat* System von *Promega* verwendet, das die gekoppelte Transkription und Translation von Plasmid-DNA in einem Reaktionsansatz erlaubt. Als Matrize wurde der *pT7*-Vektor (*Sigma*) verwendet, in den die zu exprimierende Sequenz unter der Kontrolle eines T7-Promotors kloniert war.

Reaktionsansatz (25 µl)	12,5 µl TnT Rabbit Reticulocyte Lysat 1 µl TnT Reaktionspuffer 0,5 µl T7 RNA-Polymerase 0,5 µl Aminosäure-Mix (ohne Methionin) (1 mM) 1 µl ³⁵ S-Methionin (15 mCi/ml) 0,5 µl RNase Inhibitor <i>RNaseOUT</i> (40 U/µl) 5 µl Plasmid-DNA (100 ng/µl) 4 µl H ₂ O
-------------------------	---

Der Ansatz wurde für 90 min bei 30°C inkubiert und anschließend sofort für einen *in vitro* Proteinimport in Mitochondrien verwendet.

3.3.10 *In vitro* Proteinimport in Mitochondrien

Für den *in vitro* Proteinimport wurden 50 µg Mitochondrien in 18 µl Importpuffer mit 6 µl Translationsmix bei 27°C inkubiert. Um die Importreaktion zu stoppen, wurden die Proben mit 30 µM Carbonyl-Cyanid *m*-Chlorophenylhydrazon (CCCP) gemischt, wodurch das Membranpotential über der inneren Mitochondrienmembran zerstört und der Import inhibiert wurde. Anschließend

wurden die Mitochondrien durch Zentrifugation für 10 min bei 12.000g bei 4°C pelletiert, in 20 µl CHM-Puffer resuspendiert und nicht importierte Proteine durch Zugabe von 5 µM Proteinase K (Inkubation für 30 min auf Eis) verdaut. Der Verdau wurde durch einen Proteinase-Inhibitor gestoppt und die Mitochondrien in einem Zentrifugationsschritt für 20 min bei 12.000 g bei 4°C resoliert. Die Mitochondrien wurden in SDS-Probenpuffer resuspendiert und auf einem 12 %igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Das Gel wurde anschließend für 30 min bei Raumtemperatur auf einem Schüttler in Fixierer 1 inkubiert, gefolgt von 5 min Inkubation in Fixierer 2. Nach dem Fixieren wurde das Gel luftblasenfrei in befeuchtete Ceran-Plastikfolie gewickelt und unter Vakuum für 120 min bei 80°C in einem Gelrockner getrocknet. Zur Detektion der Autoradiographie wurde ein Röntgenfilm (*Kodak X-OMAT AR*) auf das getrocknete Gel gelegt und über Nacht bei -70°C exponiert. Die Entwicklung des Röntgenfilms erfolgte am nächsten Tag mit dem Kodak-Entwicklungsgerät X-OMAT M35.

Importpuffer	220 mM Mannitol 70 mM Saccharose 2 mM HEPES-KOH (pH 7,4) 1 mM ATP	Fixierer 2	7 % (v/v) Methanol 7 % (v/v) Essigsäure 1 % (v/v) Glycerol 85 % H ₂ O
3 x Probenpuffer	200 mM Tris-Base; pH 6,7 6 % (w/v) SDS 15 % (v/v) Glycerin 10 % (v/v) β-Mercaptoethanol Bromphenolblau	CHM-Puffer	150 mM MgCl ₂ 10 mM KCl 10 mM Tris-Cl pH auf 6,7 einstellen
Fixierer 1	50 % (v/v) Methanol 10 % (v/v) Essigsäure 40 % H ₂ O		

3.4 Zellkultur

3.4.1 Isolation von Leukozyten aus Vollblut

Leukozyten können aus Vollblut durch eine Dichtegradientenzentrifugation isoliert werden.

Dazu wurden 25 ml Vollblut in einem Verhältnis von 1:1 mit Hanks-Salzlösung (*AppliChem*) gemischt und langsam auf 15 ml Ficoll-Natriumdiatrizoat-Lösung (*Ficoll-Paque; Pharmacia Biotech*) geschichtet. Durch einen Zentrifugationsschritt bei 500 g für 30 Minuten etablierte sich ein Konzentrationsgradient, indem sich die im Blut enthaltenen Zelltypen entsprechend ihrer Dichte auftrennten. Die unterste Phase enthielt aggregierte Erythrozyten und Granulozyten. Leukozyten sammelten sich mit Partikeln ähnlicher Dichte wie Thrombozyten und Monozyten in einer Schicht zwischen Plasma- und Ficollphase. Die Leukozytenphase wurde vorsichtig mit einer Pipettenspitze

abgenommen und in ein neues Gefäß überführt. Die Leukozyten wurden einmal mit Hanks-Salzlösung gewaschen und anschließend bis zur weiteren Verwendung in 1 ml Einfriermedium bei -70°C gelagert.

Ficoll-Paque	5,7 % (w/v) Ficoll 400 9 % (w/v) Natriumdiatrizoat	Hanks-Lösung	25 mM Kalziumchlorid 5,25 mM Kaliumchlorid 0,6 mM Kaliumhydrogencarbonat 0,8 mM mg Magnesiumsulfat 67,5 mM Natriumchlorid 0,35 mM <i>di</i> -Natriumhydrogenphosphat 5,5 mM D(+)-Glucose
Einfriermedium	90 % (v/v) FCS 10 % (v/v) DMSO		

3.4.2 Übernachtkultur primärer Leukozyten

Leukozyten wurden aus EDTA-Blut mittels einer Dichtegradientenzentrifugation in einem Ficoll-Natriumdiatrizoat-Gradienten isoliert (siehe Kapitel 3.4.1). Die Zell-Konzentration wurde in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Dazu wurden 10 μl Zellsuspension mit 10 μl 0,4 % (w/v) Trypanblau-Lösung gemischt und die Quadrate der Zählkammer ausgezählt. Die Zellen wurden in einer Dichte von 7×10^5 Zellen pro Vertiefung in einer 48-Well-Platte ausgesät und über Nacht in RPMI1640-Medium + 10 % FCS + 1 % Antibiotika bei 37°C und 5 % CO_2 kultiviert.

3.4.3 EBV-Transformation von Leukozyten

Als Folge der Transformation mit Epstein-Barr-Viren (EBV) werden primäre Leukozyten immortalisiert. Das zirkuläre EBV-Genom bleibt in den transfizierten Leukozyten in episomaler Form latent erhalten. Die Expression spezifischer Genprodukte, die vom EBV-Genom kodiert werden, führt zu einem unbegrenzten Wachstum der infizierten Zellen in Kultur. Es entsteht eine permanente Zelllinie.

Für die EBV-Transformation wurden frische Leukozyten aus Vollblut isoliert (s. Kapitel 3.4.1) und in 10 ml RPMI1640-Medium + 15 % FCS gewaschen, resuspendiert und die Zellzahl in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Von dieser Zellsuspension wurden 4×10^6 Zellen in eine Vertiefung einer 24-Well-Platte gegeben und mit 1 ml Kulturüberstand einer EBV-transfizierten B95-8 Zelllinie gemischt. Anschließend wurden 10 μl Cyclosporin A (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$) hinzugefügt. Die Zellsuspension wurde in einem Brutschrank bei 37°C und 5 % CO_2 inkubiert. Nach ungefähr zwei Wochen war die lymphoblastoide Zelllinie (LCL) etabliert und konnte in RPMI1640-Medium + 15 % FCS + 1 % Antibiotika (Penicillin und Streptomycin) im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO_2 weiter kultiviert werden.

3.4.4 Zellkultur eukaryontischer Zellen

Für die Untersuchung des Transportverhaltens von GFP-Fusionsproteinen haben wir SKOV-Zellen verwendet, eine aus Ovarkarzinom generierte Zelllinie. SKOV-Zellen wurden in RPMI1640-Medium + 10 % FCS + 1 % Antibiotika (Penicillin und Streptomycin) bei 37°C und 5 % CO₂ kultiviert. Primäre Hautfibroblasten von Patienten wurden in DMEM-Medium + 10 % FCS + 1 % Antibiotika bei 37°C und 5 % CO₂ kultiviert.

Adhärente Zellen wurden nach Erreichen der Konfluenz geteilt und in neuen Zellkulturflaschen angesät. Hierzu wurde das Medium abgenommen, die Zellen einmal mit PBS gewaschen und dann für 2 – 3 Minuten bei 37°C in Trypsin-EDTA inkubiert, was einen enzymatischen Abbau der Adhäsionsproteine bewirkte und zum Ablösen der Zellen vom Boden der Zellkulturflasche führte. Die abgelösten Zellen wurden durch eine Zentrifugation bei 300 g für 5 Minuten pelletiert. Das Zellpellet wurde in dem entsprechenden Nährmedium resuspendiert und die Zellen im Verhältnis von 1:2 bis 1:5 in neuen Zellkulturflaschen angesetzt.

3.4.5 Zellen einfrieren und auftauen

Zur langfristigen Lagerung wurden die adhärennten eukaryontischen Zellen in flüssigem Stickstoff eingefroren. Dazu wurden die in einer T75-Zellkulturflasche konfluent gewachsenen Zellen trypsiniert, abzentrifugiert und in 3 ml Einfriermedium resuspendiert. Die Zellen wurden in 1 ml Aliquots aufgeteilt, in Kryoröhrchen überführt und über Nacht bei -20°C gelagert. Am nächsten Tag konnten die Zellen dann in flüssigen Stickstoff überführt werden.

Das Auftauen der Zellen erfolgte in 10 ml vorgewärmten Kulturmediums. Die aufgetauten Zellen wurden bei 300 g für 5 min abzentrifugiert, in 5 ml frischem Kulturmedium aufgenommen und in einer T25-Kulturflasche im Brutschrank inkubiert.

Einfriermedium 90 % (v/v) FCS
 10 % (v/v) DMSO

3.4.6 Transfektion eukaryontischer Zellen

Eine Transfektion eukaryontischer Zellen erfolgte mit kationischen Liposomen und ermöglichte die heterologe Proteinexpression. Dabei bilden die Liposomen aus kationischen Lipiden mit der zu

transfizierenden DNA Komplexe, die mit der Zellmembran fusionieren können und die DNA in die Zelle einschleusen.

24 Stunden vor der Transfektion wurden konfluent gewachsene SKOV-Zellen 1:2 geteilt und in RPMI1640-Medium + 10 % FCS in 6-Well-Platten ausgesät, so dass die Kultur am Tag der Transfektion eine Konfluenz von ca. 80-90 % erreicht hatte. Für die Transfektion wurden 2 µg Plasmid-DNA (500 ng/µl) mit 250 µl serumfreiem RPMI1640-Medium gemischt. Anschließend wurden 5 µl *Lipofectamine 2000 (Invitrogen)* ebenfalls mit 250 µl serumfreiem RPMI1640-Medium gemischt und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde die DNA-Lösung mit der Lipofectamine-Suspension vorsichtig gemischt und für weitere 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die 500µl DNA-Liposomen-Mischung wurde zu den Zellen gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 6 h wurde das Transfektionsmedium gegen frisches RPMI1640-Medium + 10 % FCS ausgetauscht und die Zellen für weitere 18 h kultiviert, bevor sie durch Fluoreszenzmikroskopie oder Western-Blot analysiert wurden.

3.4.7 Fluoreszenzmikroskopie

Für die Fluoreszenzmikroskopie wurden SKOV-Zellen in PBS resuspendiert, auf einen Objektträger gegeben und mit einem Deckglas versehen. Die Proben wurde bei 100facher Vergrößerung und Ölimmersion sowohl im Paskontrast als auch im Fluoreszenzlicht durch ein Axioskop (Axiovert 200, Speziallichtquelle HBO50, Filtersatz 15, *Zeiss*) betrachtet. Die Dokumentation der Bilder erfolgte über eine aufgesetzte Digitalkamera (Nikon DS-M5), die mit einem Computer (Nikon DS-L1) verbunden war.

3.5 Kriterien zur Diagnose von familiärer DCM

Familiäre dilatative Kardiomyopathie wurde nach den von Mestroni et al. (1999) aufgestellten Richtlinien diagnostiziert. Die Erkrankung wird als familiär eingestuft, wenn zusätzlich zum Indexpatienten noch zwei weitere Familienmitglieder mit DCM dokumentiert werden können oder ein Verwandter ersten Grades unter 35 Jahren an einem plötzlichen Herztod verstarb.

Die Diagnose für DCM basierte auf folgenden Haupt- und Nebenkriterien. Zu den beiden Hauptkriterien zählte erstens ein linksventrikulärer enddiastolischer Durchmesser (LVEDD) oberhalb der 98. Perzentile einer Kontrollpopulation (LVEDD Klasse 3 und 4) [Vasan et al. 1997] und zweitens eine Verkürzung des Herzens während des Pumpvorgangs (*Fractional Shortening*, FS) um weniger als 25 %. Neben den beiden Hauptkriterien wurden mehrere Nebenkriterien definiert: erstens ein LVEDD zwischen der 95. und 98. Perzentile einer Kontrollpopulation (LVEDD Klasse 1 und 2), zweitens eine FS um weniger als 28 %, drittens zählte das Auftreten ungeklärter Arrhythmien oder Reizleitungsstörungen zu den Nebenkriterien und viertens ein ungeklärter Herztod vor dem 50. Lebensjahr. Ein Patient wurde als betroffen klassifiziert, wenn er mindestens eines der Hauptkriterien erfüllte oder drei Nebenkriterien diagnostiziert wurden. Patienten mit weniger als drei diagnostizierten Nebenkriterien wurden als unsicher eingestuft.

4 Ergebnisse

4.1 Positionelle Klonierung eines DCM-Gens

4.1.1 Phänotypische Charakterisierung der Familie DCM-I

Wir haben eine portugiesische Familie (Familie DCM-I) untersucht, in der 16 Familienmitglieder in 3 Generationen an dilatativer Kardiomyopathie erkrankt waren (Abbildung 4.1). Der Phänotyp folgte einem autosomal-dominanten Erbgang. Die Diagnose der familiären dilatativen Kardiomyopathie wurde gestellt, als die beiden Indexpatienten II.6 und III.8 (Onkel und Neffe) in einer portugiesischen Klinik untersucht wurden. Klinische und körperliche Daten der in die Kopplungsanalyse integrierten Probanden sind in Tabelle 4.1 zusammengefasst. Von den beiden Familiengrüdern der ersten Generation (I.1 und I.2) lagen keine klinischen Daten mehr vor; es gab jedoch Berichte von Atemnot (Dyspnoe) beim Vater I.1, der im Alter von 71 Jahren verstarb. Bei vier der sieben Geschwister der zweiten Generation (II.1, II.2, II.4 und II.6) konnte eine DCM diagnostiziert werden. Die beiden Patienten II.3 und II.5 verstarben vor Beginn der Studie mit 61 Jahren bzw. mit 50 Jahren. Nach Berichten über Vorfälle von Dyspnoe bei beiden Patienten und aufgrund der Tatsache, dass bei Kindern (III.8 bzw. III.14/III.15) beider Probanden DCM diagnostiziert wurde, stuften wir sie als Krankheitsträger ein. Proband II.7 war zum Zeitpunkt der Studie 52 Jahre alt und zeigte keine Symptome einer DCM; auch die Tochter III.18, die zum Zeitpunkt der Untersuchung 22 Jahre alt war, zeigte keine Anzeichen der DCM. In der 3. Generation hatte sich zum Zeitpunkt der Studie bereits bei neun Probanden (III.1, III.2, III.3, III.4, III.5 III.7, III.8, III.14 und III.15) eine DCM manifestiert. Die beiden Probanden III.2 und III.14 verstarben leider im Verlauf der Studie mit 43 Jahren bzw. mit 31 Jahren. Die an Patientin III.14 vorgenommene Autopsie bestätigte eine DCM. Die restlichen Probanden der 3. Generation (III.6, III.9, III.10, III.11, III.12, III.13, III.16, III.17 und III.18) und alle Familienmitglieder der 4. Generation, von denen keiner älter als 36 Jahre war, waren zum Zeitpunkt der Untersuchung asymptomatisch. Allerdings variierte in der Familie DCM-I das Alter, in dem die Erkrankung zum ersten Mal auftrat, zwischen 25 und 47 Jahren (altersabhängige Penetranz). Daher konnte die Möglichkeit nicht ausgeschlossen werden, dass sich bei einigen dieser Probanden zu einem späteren Zeitpunkt noch eine Kardiomyopathie entwickelt.

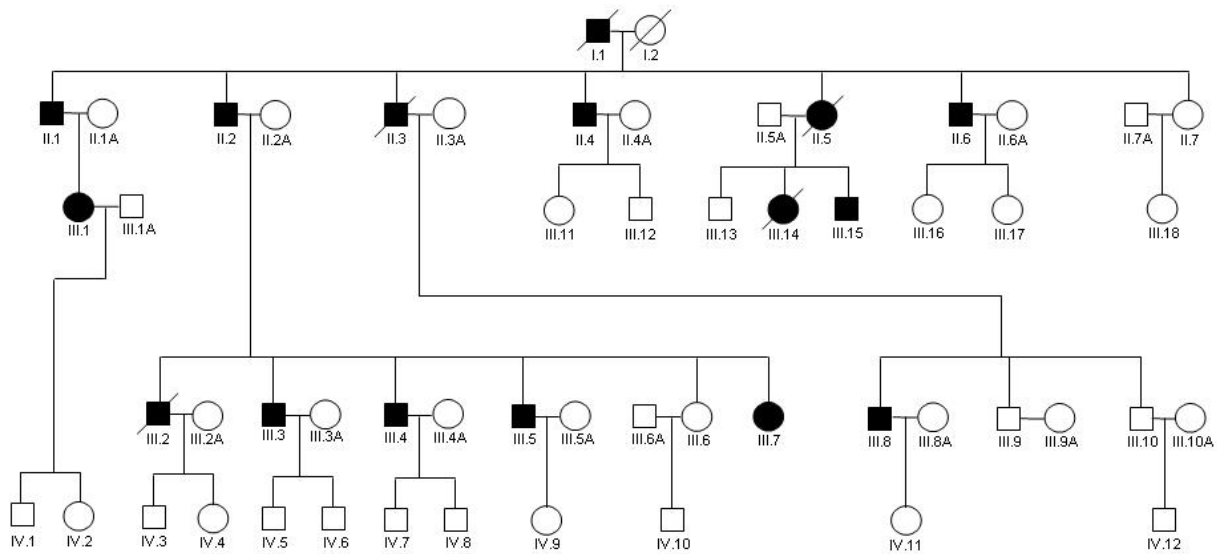


Abbildung 4.1: Stammbaum und klinischer Status der Mitglieder von Familie DCM-I. Der Phänotyp wird autosomal dominant vererbt. Ausgefüllte Symbole repräsentieren Patienten mit diagnostizierter DCM; offene Symbole repräsentieren gesunde Individuen oder Individuen ohne gesicherte DCM-Diagnose. Kreise symbolisieren Frauen und Quadrate Männer.

4.1.2 Kopplungsanalyse

Das Ziel der Kopplungsanalyse ist die Kartierung eines Locus, der mit einem speziellen phänotypischen Merkmal segregiert. Als genetische Marker für die Kopplungsanalyse kamen polymorphe Mikrosatelliten aus dem *Weber-Screeningset* zum Einsatz. Die Amplifikation der DNA der Mikrosatellitenmarker erfolgte durch eine PCR von genomischer DNA der einzelnen Familienmitglieder. Von den verwendeten Primerpaaren war jeweils ein Oligonukleotidprimer am 5'-Ende mit einem Fluoreszenzfarbstoff (FAM, TET, HEX) gekoppelt. Die Auswertung der Allelgrößen der amplifizierten Mikrosatellitenmarker erfolgte mit dem *ABI Prism 377 Genetic Analyzer (Applied Biosystems)*. Dazu wurden die PCR-Produkte zusammen mit dem Größenstandard TAMRA-500 (*Applied Biosystems*) auf einem Polyacrylamidgel entsprechend ihrer Größe elektrophoretisch aufgetrennt und am Ende des Gels über ihre Fluoreszenzmarkierung von einer CCD-Kamera detektiert. Im Vergleich zu dem mitgelaufenen Größenstandard errechnete eine Analyse-Software (*GeneScan Analysis und Genotyper-Software, Applied Biosystems*) die Länge der jeweiligen Markerallele und erstellte daraus anschließend die entsprechenden Marker-Genotypen für die Probanden. Die Genotypen bildeten die Grundlage für die Berechnung des Zweipunkt LOD-Scores mit dem Programm FASTLINKv4.1 [Cottingham et al. 1993]. Für die Berechnung des LOD-Scores bekamen die Patienten mit einer gesicherten Diagnose für DCM den Status *affected*, während alle anderen Probanden aufgrund der altersabhängigen Penetranz als *unknown* gewertet wurden („*affected-only*“-Methode). Darüber hinaus wurden für die Berechnung des LOD-Scores folgende Annahmen ge-

troffen: autosomal dominanter Erbgang, 100 % Penetranz, eine Allelfrequenz des Krankheitsgens von 0,1 % und eine Gleichverteilung der Allelfrequenzen der einzelnen Mikrosatellitenmarker.

Pro-band	Sex	Alter	Größe [cm]	Klinischer Phänotyp	LVEDD [mm]	LVEDD Klasse	FS [%]	Status
I-1	M	71†	N/A	Dyspnoe	N/A	N/A	N/A	affected
I-2	F	N/A	N/A	asymptomatisch	N/A	N/A	N/A	unaffected
II-1	M	73	150	Dyspnoe	84	4	13	affected
II-2	M	69	155	Dyspnoe	71	4	10	affected
II-3	M	61†	N/A	Dyspnoe	N/A	N/A	N/A	affected
II-4	M	64	164	Pulmonare Ödeme	70	4	19	affected
II-5	F	50†	N/A	Dyspnoe	N/A	N/A	N/A	affected
II-6	M	54	164	asymptomatisch	64	4	28	affected
II-7	F	52	155	asymptomatisch	48	0	38	unaffected
III-1	F	40	153	asymptomatisch	55	4	35	affected
III-2	M	43†	164	Herzversagen	83	4	5	affected
III-3	M	37	168	Dyspnoe	63	3	19	affected
III-4	M	42	162	asymptomatisch	63	4	25	affected
III-5	M	35	172	asymptomatisch	62	3	34	unknown
III-6	F	31	157	asymptomatisch	53	2	34	unknown
III-7	F	25	160	Dyspnoe	61	4	26	affected
III-8	M	41	169	Dyspnoe; Kammerflimmern	83	4	15	affected
III-9	M	36	165	asymptomatisch	57	2	42	unknown
III-10	M	30	168	asymptomatisch	55	1	31	unknown
III-11	F	27	155	asymptomatisch	47	0	28	unknown
III-12	M	25	153	asymptomatisch	56	2	38	unknown
III-13	M	36	166	asymptomatisch	58	2	32	unknown
III-14	F	31†	N/A	Autopsie	N/A	N/A	N/A	affected
III-15	M	18	170	asymptomatisch	58	2	27	affected
III-16	F	26	160	asymptomatisch	48	0	39	unknown
III-17	F	21	158	asymptomatisch	44	0	39	unknown
III-18	F	22	167	asymptomatisch	45	0	38	unaffected

Tabelle 4.1: Klinische Daten der Mitglieder von Familie DCM-I. F = Frau; M = Mann; Alter = Alter zum Zeitpunkt der klinischen Untersuchung oder Alter bei Tod; LVEDD = linksventrikulärer enddiastolischer Durchmesser; FS = Verkürzung der Herzens beim Pumpvorgang; betroffen = LVEDD-Klasse 3+4 oder LVEDD-Klasse 2 + FS < 28%; nicht betroffen = LVEDD-Klasse 0 + FS > 28%; N/A = keine Daten vorhanden; † = verstorben

Da bereits 20 DCM-verursachende Gene und 10 weitere Loci bekannt sind, untersuchten wir vor der genomweiten Kopplungsanalyse, ob eine Assoziation zwischen diesen Loci und dem Phänotyp in der Familie DCM-I bestand. Dazu wurde für jeden dieser Loci zwei in der Literatur beschriebene Mikrosatellitenmarker ausgewählt und ihre physikalische Position sowie ihr Abstand zu den Kandidatenloci mit Hilfe der Genkarte aus der elektronischen Datenbank *The Genome Database*⁵ bestimmt. Von den getesteten Markern erreichte keiner einen Zweipunkt LOD-Score, der größer als 1,5 war (Tabelle 4.2). Die getesteten Marker sind in Tabelle 4.2 zusammengefasst. Für jeden Locus wurde bei mindestens einem der Mikrosatellitenmarker ein negativer LOD-Score $Z < -1,6$ errechnet (Tabelle 4.2). Bei 21 der 23 Loci war der LOD-Score mit $Z < -2,0$ sogar signifikant negativ. Daher konnte eine Kopplung für alle bisher bekannten DCM-verursachenden Gene und Loci mit dem Phänotyp in der Familie DCM-I ausgeschlossen werden, was darauf hindeutete, dass die Krankheit in dieser Familie durch eine Mutation in einem neuen DCM-Gen verursacht wird.

Für die genomweite Kopplungsanalyse wurden 379 hochpolymorphe Mikrosatellitenmarker aus der 10. Version des *Weber-Screeningsets*⁶ vom *Cooperative Human Linkage Center (CHLC)* verwendet. Da der Phänotyp in der Familie DCM-I einem autosomal-dominanten Erbgang folgte, wurden nur die Mikrosatellitenmarker, die auf den 22 Autosomen lokalisiert sind, amplifiziert. Die Marker hatten einen durchschnittlichen Abstand von 9 cM und wiesen eine durchschnittliche Heterozygotie von 74 % auf. Die Position der verwendeten Mikrosatellitenmarker basierte auf den genetischen Karten von *Marshfield*⁷ [Broman et al. 1998] und *DeCode Genetics* [Kong et al. 2002].

Von den Markern des Screeningsets waren 54 nicht informativ oder es wurde kein Amplifikat erhalten. Als Ersatz wurden zusätzliche Marker, die in unmittelbarer Nachbarschaft der ausgefallenen Marker annotiert waren, aus den genetischen Karten von *DeCode Genetics* ausgewählt und genotypisiert, was es uns ermöglichte diese Regionen trotzdem zu evaluieren. Für ca. 80 % des Genoms konnte eine Kopplung mit dem Phänotyp ausgeschlossen werden. Keiner der genotypisierten Marker erreichte einen signifikant positiven LOD-Score $Z > 3,0$ (Abbildung 4.2). Allerdings war es möglich drei Loci mit einem LOD-Score $Z > 1,5$ zu identifizieren (Abbildung 4.2): auf Chromosom 6p23.1 Marker D6S1051 (51 cM) mit $Z = 1,67$ bei $\theta = 0,00$; auf Chromosom 7q23 zwei Marker mit einem Abstand von 19 cM – D7S821 (109 cM) mit $Z = 2,11$ bei $\theta = 0,00$ und D7S3061 (128 cM) mit $Z = 2,59$ bei $\theta = 0,05$ und auf Chromosom 12q24 zwei Marker mit einem Abstand von 41 cM – PAH (109 cM) mit $Z = 1,69$ bei $\theta = 0,10$ und GATA41E12 (150 cM) mit $Z = 1,76$ bei $\theta = 0,10$.

⁵ <http://www.gdb.org/>

⁶ <http://research.marshfieldclinic.org/genetics/GeneticResearch/sets/Combo10Frames.htm>

⁷ <http://research.marshfieldclinic.org/genetics/GeneticResearch/compMaps.asp>

Locus	Genetischer Marker	Genetische Position [cM]	LOD-Score
1q22 (LMNA)	D1S305	159	-2,01
	D1S1653	164	0,41
1q32 (TNNT2)	D1S1660	212	1,00
	GATA124F08	226	-1,66
1q42-43 (RYR2)	D1S2678	256	0,19
	D1S517	263	-3,21
2q14-22	D2S1328	133	-8,70
	D2S2215	142	-6,25
2q31 (TTN)	D2S1776	173	-7,31
	D2S335	178	-6,19
2q31.1-32.3	D2S1391	184	-6,40
	D2S1384	200	-8,67
2q35 (DES)	D2S163	221	-6,54
	D2S1363	227	-1,41
3p22-25	D3S1304	22	-3,02
	D3S1560	19	-3,70
3p23	D3S2403	37	0,39
	D3S4545	26	-5,92
5q33 (SGCD)	D5S1978	156	-8,60
	D5S820	159	-7,58
6p24 (DSP)	D6S263	15	-6,30
	F13A1	9	0,40
6q12-16	D6S1652	93	-1,73
	D6S1056	103	-1,19
6q23	D6S262	130	-0,96
	D6S1040	129	-4,01
6q23-24 (EYA4)	D6S262	130	-1,50
	D6S1009	138	-4,41
9q13-22	D9S922	80	-4,43
	D9S167	83	-6,30
10p12-14	D10S191	38	-0,96
	D10S1430	33	-3,34
10q21-23 (VCL)	D10S2327	101	-3,38
	D10S1686	105	-4,61
14q11 (MYH7)	D14S990	15	-2,57
	D14S1280	26	-4,42
14q12-22	D14S608	28	-8,29
	D14S587	56	-3,06
14q23-24	D14S980	60	-3,00
	D14S592	67	-1,16
15q14 (ACTC)	GAAA1C11	31	0,53
	GATA50C03	35	-4,18
15q22 (TPM1)	D15S987	59	0,41
	D15S159	59	-3,31
17q21 (JUP)	D17S2195	107	-6,30
	D17S2180	67	-1,85

Tabelle 4.2: Zweipunkt LOD-Score für bekannte DCM-verursachende Gene und mit DCM-assoziierte Loci. Ein LOD-Score von $Z < -2,0$ war hinreichend für einen Ausschluss des Locus.

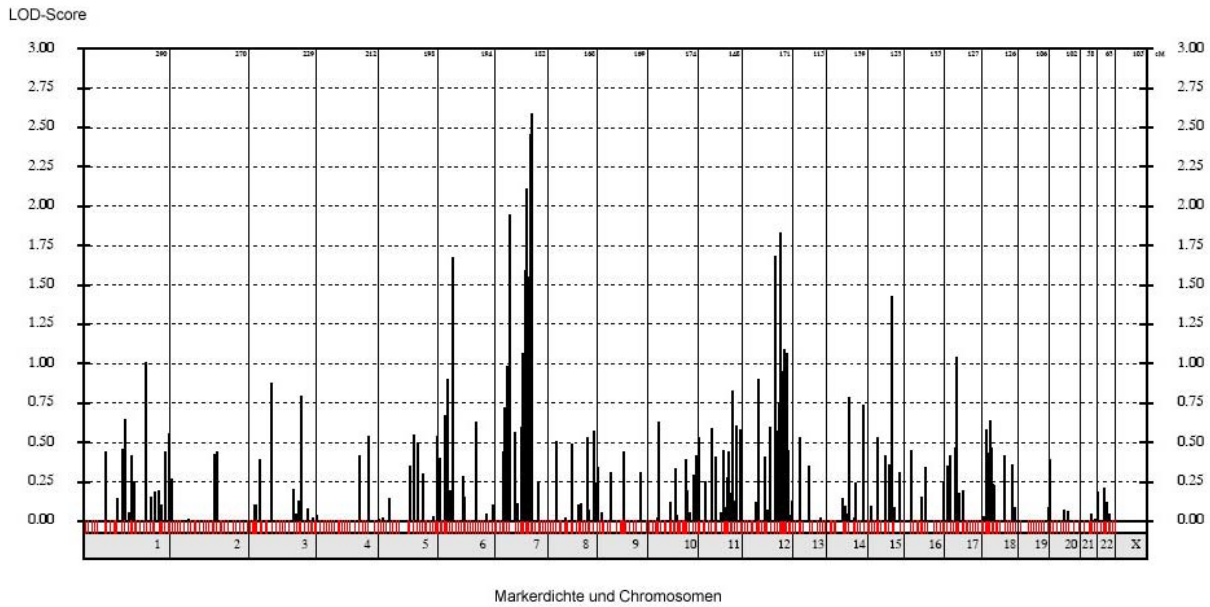


Abbildung 4.2: Zweipunkt LOD-Scores der Mikrosatellitenmarker aus dem *Weber-Screening-Set* und ihre chromosomale Position. Viel versprechende Marker mit einem LOD-Score von $Z > 1,5$ wurden auf Chromosom 6, 7 und 12 identifiziert. Die roten Markierungen symbolisieren Marker mit einem negativen LOD-Score.

Auf Chromosom 6 hatten die beiden D6S1051 flankierenden Marker D6S2439 (42 cM) und D6S2410 (73 cM) jeweils einen negativen LOD-Score von $Z = -3,31$ bzw. von $Z = -1,51$ bei $\theta = 0,00$ (Tabelle 4.3) und erzielten auch bei höheren Werten für die Rekombinationsfraktion θ keinen positiven LOD-Score. Daher konnte dieser Locus auf Chromosom 6 als Kandidatenregion ausgeschlossen werden.

Marker	Physikalische Position [Mb]	Rekombinationsfraktion					
		0.00	0.05	0.10	0.20	0.30	max LOD
D6S1959	34,23	0,90	0,90	0,84	0,66	0,40	0,90; $\theta = 0,01$
D6S2439	42,27	-3,31	-0,57	-0,09	0,19	0,17	0,19; $\theta = 0,20$
D6S1051	50,75	1,67	1,54	1,38	1,02	0,60	1,67; $\theta = 0,00$
D6S2410	73,13	-1,51	-0,67	-0,40	-0,15	-0,04	0,00; $\theta = 0,50$
D6S1053	80,45	-5,64	-1,49	-0,77	-0,20	-0,03	0,00; $\theta = 0,40$
D6S1031	88,63	-1,18	-0,38	0,01	0,28	0,26	0,28; $\theta = 0,20$
D6S1652	92,85	-1,73	-0,13	0,07	0,15	0,11	0,15; $\theta = 0,20$
D6S1056	102,81	-1,21	-0,72	-0,48	-0,21	-0,07	0,00; $\theta = 0,50$
D6S1021	112,20	-3,91	-1,58	-0,99	-0,42	-0,15	0,00; $\theta = 0,50$
D6S474	118,64	-4,07	-0,83	-0,38	-0,07	0,00	0,01; $\theta = 0,40$
D6S262	130,00	-0,96	0,53	0,63	0,52	0,31	0,63; $\theta = 0,10$
D6S1009	137,74	-4,41	-1,12	-0,63	-0,23	-0,08	0,00; $\theta = 0,50$

Tabelle 4.3: Zweipunkt LOD-Scores von Mikrosatellitenmarkern auf Chromosom 6. Signifikante LOD-Scores mit $Z < -2,0$ sind fett gedruckt.

Für die Loci auf Chromosom 7 und 12 wurden zusätzliche Mikrosatellitenmarker (Tabelle 4.4 und 4.5: mit Sternchen markiert) zur Verifizierung der Kandidatenregion genotypisiert. Es wurden Marker aus den genetischen Karten von *DeCode Genetics* oder *Marshfield* ausgewählt, die eine hohe Heterozygotie aufwiesen und zwischen den beiden Markern mit den positiven LOD-Scores annotiert waren. Auf Chromosom 12 konnten neben den Markern PAH und GATA41E12 noch weitere Mikrosatellitenmarker mit einem positiven LOD-Score identifiziert werden: Marker D12S2073 (140 cM) mit $Z = 1,45$ bei $\theta = 0,10$ und Marker D12S2082 (131 cM) mit einem maximalen $Z = 1,83$ bei $\theta = 0,00$ (Tabelle 4.4). Für die anderen fünf zusätzlich genotypisierten Marker errechnete sich ein signifikant negativer LOD-Score von $Z < -3,0$ (Tabelle 4.4). Dass keine zwei benachbarten Marker mit einem positiven LOD-Score gefunden werden konnten, machte es unwahrscheinlich, dass die Kandidatenregion auf Chromosom 12 lokalisiert war.

Marker	Physikalische Position [Mb]	Rekombinationsfraktion					max LOD
		0.00	0.05	0.10	0.20	0.30	
D12S1294	79,00	-0,61	0,24	0,38	0,38	0,24	0,40; $\theta = 0,15$
D12S1052	83,19	-3,18	-0,70	-0,27	0,02	0,07	0,07; $\theta = 0,30$
D12S1064	95,03	-2,73	0,13	0,49	0,58	0,39	0,60; $\theta = 0,15$
PAH	109,47	0,10	1,61	1,69	1,48	1,06	1,69; $\theta = 0,10$
D12S338*	111,87	-3,14	0,00	0,37	0,48	0,35	0,48; $\theta = 0,20$
D12S1339*	118,00	-3,29	-0,05	0,39	0,63	0,58	0,63; $\theta = 0,20$
D12S1583*	119,60	-4,50	0,04	0,66	0,95	0,80	0,95; $\theta = 0,20$
D12S1341*	123,00	-3,91	-0,91	-0,44	-0,09	-0,02	0,00; $\theta = 0,50$
D12S79	125,26	-4,80	-0,24	0,40	0,75	0,65	0,75; $\theta = 0,20$
D12S2082*	130,94	1,83	1,66	1,48	1,09	0,67	1,83; $\theta = 0,00$
D12S86*	134,54	-4,50	0,04	0,66	0,95	0,80	0,95; $\theta = 0,20$
D12S395	137,00	-3,59	-0,33	0,13	0,43	0,43	0,43; $\theta = 0,30$
D12S2073*	140,00	-0,05	1,41	1,45	1,20	0,76	1,45; $\theta = 0,10$
GATA41E12	149,60	0,59	1,74	1,76	1,44	0,94	1,76; $\theta = 0,10$

Tabelle 4.4: Zweipunkt LOD-Scores von Mikrosatellitenmarkern auf Chromosom 12. Die mit Sternchen markierten Marker sind nicht im *Weber-Screeningset* enthalten, sondern wurden zur Verifizierung der Kandidatenregion zusätzlich genotypisiert. Signifikante LOD-Scores mit $Z < -2,0$ sind fett gedruckt.

Die Genotypisierung zusätzlicher Marker auf Chromosom 7 identifizierte zwei Mikrosatellitenmarker mit einem maximalen LOD-Score von $Z = 4,20$ für $\theta = 0,00$: Marker D7S501 (119 cM) und D7S471 (123 cM) (Tabelle 4.5). Auch der Marker D7S523 erzielte einen signifikant positiven LOD-Score von $Z = 3,54$ bei $\theta = 0,00$. Die Anzahl der dicht benachbarten Marker mit einem posi-

tiven LOD-Score, deutete daraufhin, dass die Kandidatenregion mit hoher Wahrscheinlichkeit auf Chromosom 7 lokalisiert ist.

Marker	Physikalische Position [Mb]	Rekombinationsfraktion					max LOD
		0.00	0.05	0.10	0.20	0.30	
D7S1799	103,79	0,29	1,48	1,55	1,34	0,95	1,55; $\theta = 0,10$
D7S2545*	104,31	-0,51	0,73	0,85	0,76	0,52	0,85; $\theta = 0,10$
D7S2453*	105,25	0,54	0,49	0,44	0,34	0,23	0,54; $\theta = 0,00$
D7S501*	106,03	4,20	3,87	3,52	2,75	1,88	4,20; $\theta = 0,00$
D7S2418*	109,57	2,84	2,56	2,27	1,68	1,07	2,84; $\theta = 0,00$
AFM287vc9*	109,99	1,68	1,55	1,41	1,12	0,79	1,68; $\theta = 0,00$
D7S523*	111,30	3,54	3,48	2,93	2,26	1,51	3,54; $\theta = 0,00$
D7S471*	111,63	4,20	3,87	3,52	2,75	1,88	4,20; $\theta = 0,00$
D7S2554*	114,04	1,06	2,46	2,28	2,26	1,44	2,46; $\theta = 0,05$
D7S2847*	118,41	0,96	2,36	2,18	1,95	1,35	2,36; $\theta = 0,05$
D7S3061	122,88	1,20	2,59	2,56	2,15	1,52	2,59; $\theta = 0,05$
D7S1804	131,74	-4,04	-0,80	-0,36	-0,07	0,00	0,01; $\theta = 0,40$
D7S1824	139,47	-3,90	-0,61	-0,13	0,19	0,24	0,24; $\theta = 0,30$

Tabelle 4.5: Zweipunkt LOD-Scores von Mikrosatellitenmarkern auf Chromosom 7. Signifikante LOD-Scores mit $Z > 3,0$ sind fett gedruckt. Der maximale LOD-Score von $Z = 4,20$ bei $\theta = 0,00$ wird mit den Markern D7S501 und D7S471 erreicht. Die mit Sternchen markierten Marker sind nicht im *Weber-Screeningset* enthalten, sondern wurden zur Verifizierung der Kandidatenregion zusätzlich genotypisiert.

Zusätzlich zu der LOD-Score Berechnung haben wir eine Haplotypenanalyse durchgeführt, um Rekombinationsereignisse bei den Familienmitgliedern zu identifizieren. Bei der Haplotypenanalyse kann ein minimaler chromosomaler Abschnitt definiert werden, der mit dem Phänotyp vererbt wird und in dem die krankheitsverursachende Mutation lokalisiert ist. Die Erstellung der Haplotypen erfolgte mit Hilfe der *Merlin*-Software⁸. Dabei wurden die Allele nach den mendelschen Vererbungsregeln so auf die beiden Chromatiden verteilt, dass die Rekombinationsrate möglichst gering blieb. Aufgrund fehlender DNA-Proben wurden die Haplotypen für die Probanden I.1, I.2, II.3 und II.5, so weit möglich, rekonstruiert.

Für Chromosom 6 Haplotypen ließ sich kein Haplotyp identifizieren, den alle erkrankten Familienmitglieder gemeinsam hatten (Abbildung 4.3). Die Patienten III.8 und III.15 besaßen keine Markerallele, die mit dem möglichen krankheits-assoziierten Haplotyp der anderen an DCM erkrankten Familienmitgliedern überlappten. Damit ließ sich Chromosom 6 als Kandidatenregion ausschließen.

⁸ <http://www.sph.umich.edu/csg/abecasis/Merlin/index.html>

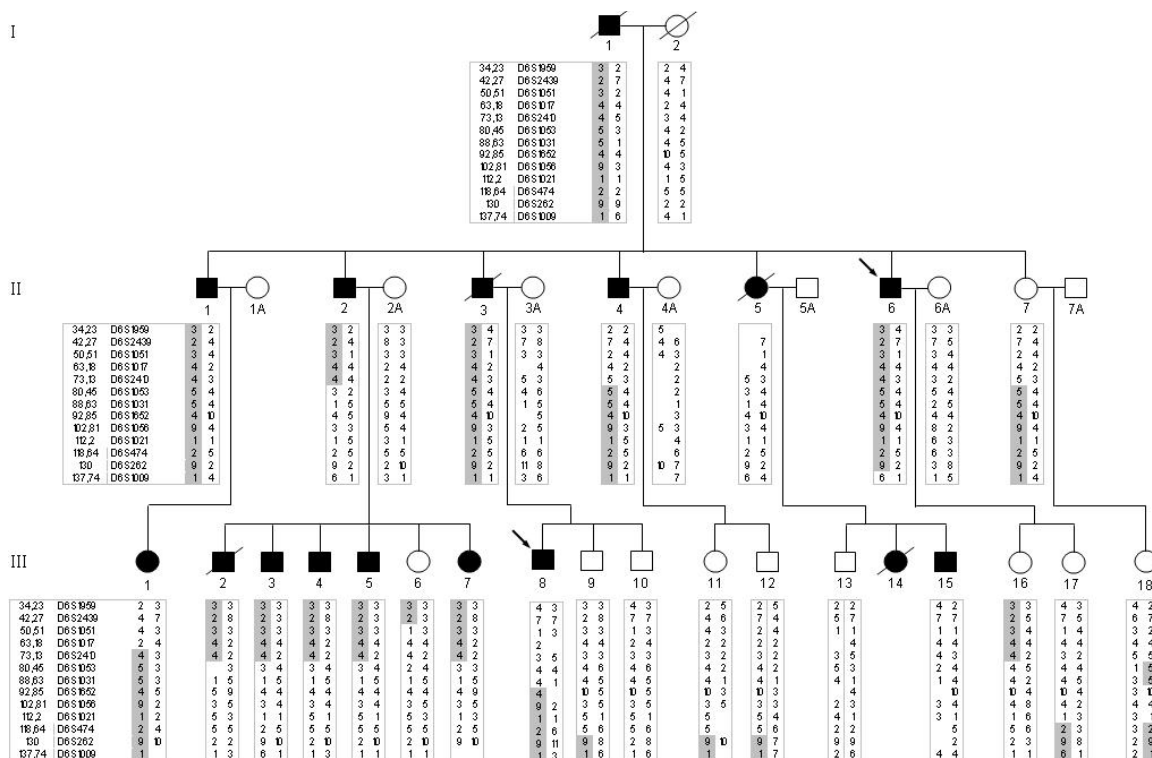


Abbildung 4.3: Genetische Daten der Mitglieder von Familie DCM-I auf Chromosom 6. Ausgefüllte Symbole repräsentieren Patienten mit diagnostizierter DCM; offene Symbole repräsentieren gesunde Individuen oder Individuen ohne gesicherte DCM-Diagnose. Kreise symbolisieren Frauen und Quadrate Männer. Die physikalische Position der Marker ist in Mb angegeben, basierend auf der genetischen Karte des *International Human Genome Sequencing Consortium* vom Mai 2004 (NCBI Build 35). Lücken in den Genotypen treten dort auf, wo es nicht möglich war die Allele aufgrund technischer Probleme zu bestimmen oder zu rekonstruieren. Der mögliche krankheits-assoziierte Haplotyp ist grau unterlegt. Der Indexpatient III.8 und Patient III.15 teilen den möglichen krankheits-assoziierten Haplotyp nicht mit den anderen erkrankten Familienmitgliedern.

Auch auf Chromosom 12 besaßen nur 14 der 16 erkrankten Patienten einen gemeinsamen Haplotyp zwischen den Marker D12S1294 und PAH. Dieser Haplotyp segregierte aber nicht mit Patient II.1 und seiner Tochter III.1 (Abbildung 4.4). Da aber sowohl beim Vater II.1 als auch bei der Tochter III.1 DCM diagnostiziert wurde, schlossen wir eine Phänokopie in diesem Fall aus und damit auch Chromosom 12 als mögliche Kandidatenregion.

Die Bestimmung der Haplotypen auf Chromosom 7 identifizierte einen chromosomalen Abschnitt auf dem langen Arm, der vollständig mit dem Phänotyp in der Familie DCM-I segregierte. Die Haplotypenanalyse erlaubte die Eingrenzung einer minimalen krankheits-assoziierten Region, die distal durch ein Rekombinationsereignis bei Patient III.5 zwischen den Markern D7S471 und D7S2554 begrenzt wurde, und proximal durch ein Rekombinationsereignis bei den beiden Patienten III.14 und III.15 zwischen den Markern D7S2545 und D7S2453 (Abbildung 4.5). Die Kandidatenregion erstreckte sich damit über 9,09 cM oder 9,73 Mb zwischen Marker D7S2545 und Marker D7S2554 (Abbildung 4.6). Eine weitere Eingrenzung der Kandidatenregion war mit den verfügbaren Meiosen und Rekombinationsereignissen und den getesteten Markern nicht möglich.

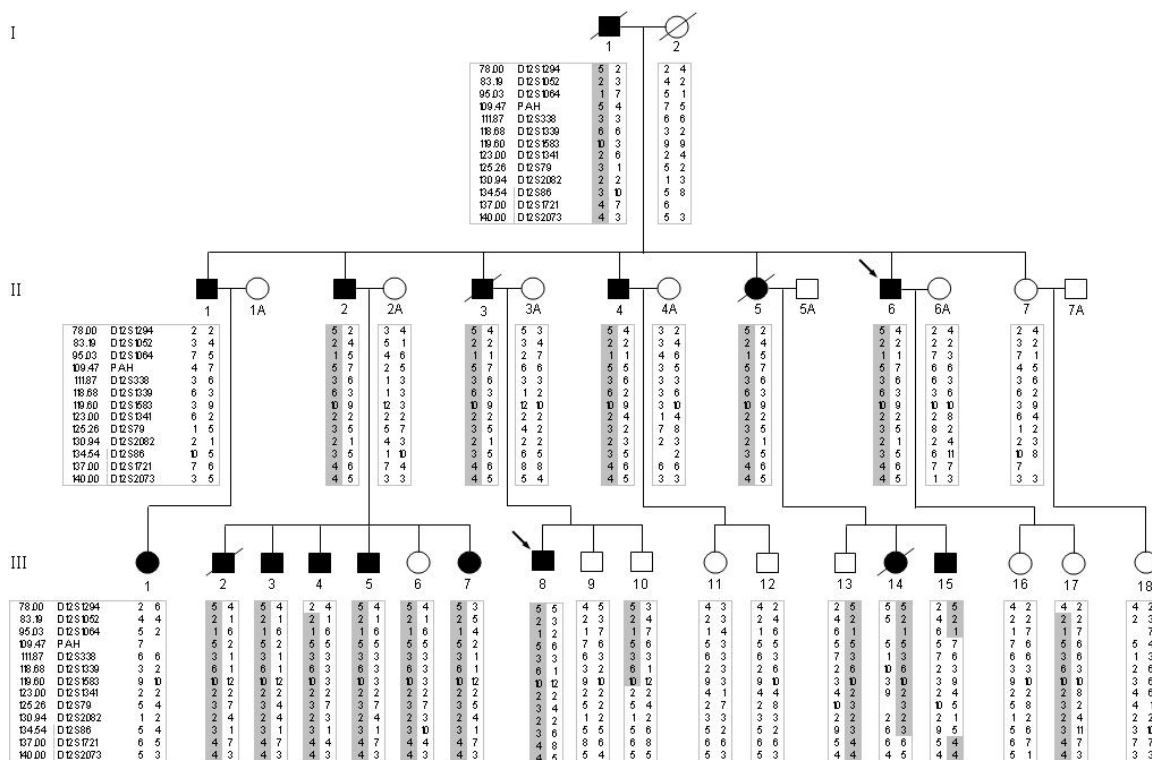


Abbildung 4.4: Genetische Daten der Familienmitglieder auf Chromosom 12. Ausgefüllte Symbole repräsentieren Patienten mit diagnostizierter DCM; offene Symbole repräsentieren gesunde Individuen oder Individuen ohne gesicherte DCM-Diagnose. Kreise symbolisieren Frauen und Quadrate Männer. Die physikalische Position der Marker ist in Mb angegeben, basierend auf der genetischen Karte des *International Human Genome Sequencing Consortium* vom Mai 2004 (NCBI Build 35). Lücken in den Genotypen treten dort auf, wo es nicht möglich war die Allele aufgrund technischer Probleme zu bestimmen oder zu rekonstruieren. Der mögliche krankheits-assoziierte Haplotyp ist grau unterlegt. Der Patient II.1 und seine Tochter III.1 haben dagegen einen anderen Haplotyp, ohne Überlappung mit dem krankheits-assoziierten Haplotyp.

4.1.3 Mutationsanalyse der Kandidatengene

In der UCSC-Genomdatenbank⁹ (*Assembly Mai 2004*) waren 32 bekannte Gene innerhalb der Kandidatenregion annotiert sowie 6 weitere aufgrund von Sequenzvergleichen vorhergesagte mögliche Transkripte (Tabelle 4.6). Die Gene wurden anhand der in den *GeneCards*¹⁰, der in der OMIM-Datenbank¹¹ und der Literatur vorhandenen Informationen in funktionelle Gruppen unterteilt: Apoptose / oxidativer Stress, Zellwachstum / Zellzyklus, extrazelluläre Matrix, ribosomale Proteine, Ionen-Transport, Metabolismus, RNA-Prozessierung, Signaltransduktion, Translationsregulation / Proteinmodifikation und Transkriptionsfaktoren. Darüber hinaus wurden Daten über bekannte

⁹ <http://genome.ucsc.edu/>

¹⁰ <http://www.genecards.org>

¹¹ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=OMIM>

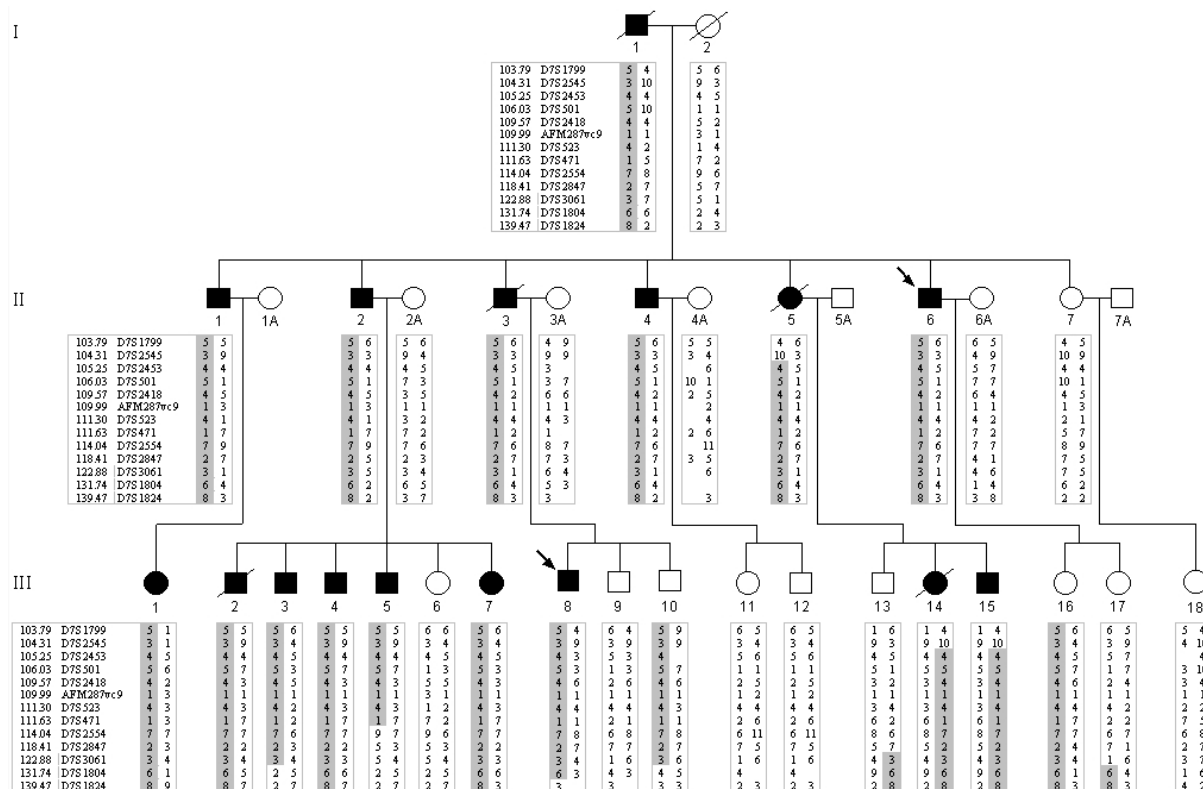


Abbildung 4.5: Genetische Daten der Familienmitglieder auf Chromosom 7. Ausgefüllte Symbole repräsentieren Patienten mit diagnostizierter DCM; offene Symbole repräsentieren gesunde Individuen oder Individuen ohne gesicherte DCM-Diagnose. Kreise symbolisieren Frauen und Quadrate Männer. Die physikalische Position der Marker ist in Mb angegeben, basierend auf der genetischen Karte des *International Human Genome Sequencing Consortium* vom Mai 2004 (NCBI Build 35). Lücken in den Genotypen treten dort auf, wo es nicht möglich war die Allele aufgrund technischer Probleme zu bestimmen oder zu rekonstruieren. Der krankheits-assoziierte Haplotyp ist grau unterlegt. Alle mit DCM diagnostizierten Familienmitglieder besitzen einen gemeinsamen Haplotyp.

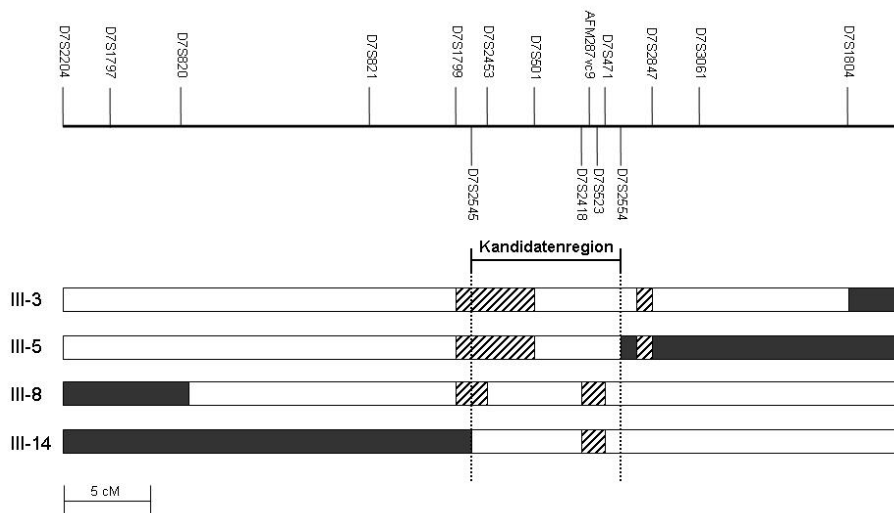


Abbildung 4.6: Die minimale DCM-assoziierte Kandidatenregion erstreckt sich über 9,73 Mb auf dem langen Arm von Chromosom 7. Das Intervall wird durch Rekombinationsereignisse in den betroffenen Patienten III.5 und III.14 definiert. Die Region wird durch den Marker D7S2545 proximal und durch den Marker D7S2554 distal begrenzt. Weiße Balken symbolisieren den Krankheits-assoziierten Haplotyp und schwarze davon abweichende. Nicht-informative Genotypen sind gestreift dargestellt.

Tiermodelle, mit den Genen assoziierte humane Krankheiten und Expressionsdaten aus der vorhandenen Literatur gesammelt.

Anhand dieser Daten haben wir eine Rangliste der Gene in der Kandidatenregion erstellt, mögliche DCM-Gene zu indentifizieren. Da keines der Gene für Proteine des Zytoskeletts oder für Proteine des Sarkomers kodierte, haben wir uns zuerst auf die Gene für Laminin beta-1 (LAMB1) und Laminin beta-4 (LAMB4) konzentriert. Laminine sind Bestandteil der Basallamina von Kardiomyozyten und binden an Kollagen, Proteoglykane und Transmembran-Rezeptoren. Aufgrund ihrer Lokalisation in der extrazellulären Matrix und der Tatsache, dass sie wie andere Komponenten der extrazellulären Matrix durch mechanischen Stress reguliert werden, passen Laminine gut zu der Hypothese, dass DCM durch eine Beeinträchtigung der Kraftübertragung verursacht werden kann.

Für das nächste Kandidatengen nach LAMB-1 und LAMB-4, die Phosphoinosit-3-Kinase (PIK3CG) konnte gezeigt werden, dass es die Kontraktilität von Kardiomyozyten negativ beeinflusst [Crackower et al. 2002]. Außerdem wurden bei PIK3CG-defizienten Mäusen kardiale Schäden nach Aorten-Abschnürung (TAC) beobachtet, einer effizienten Methode, um linksventrikuläre Hypertrophie zu induzieren [Patrucco et al. 2004].

Aber auch die in der Region lokalisierten Transkriptionsfaktoren HBP1, ZNF277 und FOXP2 standen oben auf der Liste der interessanten Kandidatengene, da Schönberger et al. (2005) zeigen konnten, dass eine Deletion im transkriptionellen Koaktivator EYA4 dilatative Kardiomyopathie verursacht. Die Kandidatengene, die als nächstes folgten, waren die Kinase PRKAR2B und die Phosphatase PPP1R3A. PRKAR2B kodiert für eine Untereinheit der cAMP-abhängigen Proteinkinase, und PPP1R3A kodiert für eine muskelspezifische Untereinheit der Proteinphosphatase 1, die in den Kohlenhydrat- und Lipidmetabolismus involviert ist. Weitere interessante Gene in der minimalen Kandidatenregion waren die im Zellmetabolismus involvierten Gene DLD und IPLA2, da eine Reihe von Studien existieren, die einen Zusammenhang zwischen dem mitochondrialen Energiemetabolismus und der Progression von Kardiomyopathien beschreiben [Corbett et al. 1998] [Fountoulakis et al. 2004].

Die Exon-Intron Strukturen der innerhalb der Kandidatenregion liegenden Gene wurden der humanen Referenzsequenz des *International Human Sequencing Consortium* (NCBI Build 35, May 2004) entnommen. Primer für die Amplifikation der entsprechenden DNA-Sequenzen wurden unter Verwendung der *Primer3*-Software¹² des *Whitehead Instituts* ausgewählt. Ausgehend von genomischer DNA wurden nacheinander die proteinkodierenden Exons aller 38 in der Kandidatenre-

¹² <http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3.cgi>

Gen	OMIM	Tiermodell	Funktion
MLL5	608444		Zellwachstum / Zellzyklus
SRPK2	602980		RNA-Prozessierung
FLJ20485			Zellwachstum / Zellzyklus
RINT-1			
ATXN7L4			
FLJ23834			
SYPL			Signaltransduktion / Zell-Zell-Kommunikation
PBEF1			Metabolismus
FLJ36031			
PIK3CG	601232	Isoproterenol behandelte KO-Mäuse haben verminderte Hypertrophie	Signaltransduktion / Zell-Zell-Kommunikation
PRKAR2B	176912	PRKAR2B -/- Mäuse scheinen gesund	Signaltransduktion / Zell-Zell-Kommunikation
HBP1			Transkriptionsfaktor
COG5	606821		Proteinmodifikation / Proteintransport
GPR22	601910		Signaltransduktion / Zell-Zell-Kommunikation
PP35			Apoptose
BCAP29			Apoptose
SLC26A4	Pendred-Syndrom (605646)	Pds -/- Mäuse sind taub	Ionen-Transporter
CBLL1	606872		Signaltransduktion / Zell-Zell-Kommunikation
SLC26A3	Kongenitale Chlorid Diarrhoe (126650)		Ionen-Transporter
DLD	Leigh-Syndrom; Lactic Acidose (246900)	DLD-/- Mäuse embryonal lethal; DLD+/- ohne Phänotyp	Metabolismus
LAMB1	Cutis Laxa, kardiale Abnormalitäten, diaphragmatic hernia (150240)		extrazelluläre Matrix
LAMB4			extrazelluläre Matrix
NRCAM	601581		Signaltransduktion / Zell-Zell-Kommunikation
IPLA2			Metabolismus
THAP5			
DNAJB9	602634		Proteinmodifikation / Proteintransport
IMMP2L	Tourette-Syndrom (605977)		
LRRN3			Signaltransduktion / Zell-Zell-Kommunikation
DOCK4	607679		Signaltransduktion / Zell-Zell-Kommunikation
ZNF277	605465		Transkriptionsfaktor
IFRD1	603502		Zellwachstum / Zellzyklus
FLJ39575			
FLJ13576			
FLJ31818			
NPM1P14			
GPR 85			Signaltransduktion / Zell-Zell-Kommunikation
PPP1R3A			Signaltransduktion / Zell-Zell-Kommunikation
FOXP2			Transkriptionsfaktor

Tabelle 4.6: Gene in der Kandidatenregion auf Chromosom 7 zwischen den Markern D7S2545 und D7S2554.

gion liegenden Gene sowie wenigstens 50 bp der flankierenden Introns durch PCR amplifiziert und die PCR-Produkte direkt sequenziert. Für die viel versprechenden Kandidatengene LAMB1 und LAMB4, PIK3CG, PRKAR2B sowie PPP1R3A haben wir zusätzlich zu den proteinkodierenden Exons auch die 5'- und 3'-untranslatierten Regionen (UTR) sequenziert.

Insgesamt konnten wir bei der Mutationsanalyse in den proteinkodierenden Exons der Kandidatengene acht neue Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNP) identifizieren (Tabelle 4.7). Allerdings führten nur vier von denen zu einem Aminosäureaustausch. Die Variante Isoleucin/Valin an Aminosäureposition 25 in Exon 2 von FLJ39575 sowie die beiden Polymorphismen Leucin/Isoleucin an Position 807 und Threonin/Alanin an Position 822 in Exon 4 von PPP1R3A segregierten nicht mit dem Phänotyp in der Familie und konnten daher als krankheitsverursachend ausgeschlossen werden. Der Polymorphismus Serin/Phenylalanin an Position 128 in Exon 4 von FLJ39575 segregierte mit dem Phänotyp und war nicht in der SNP-Datenbank *dbSNP*¹³ des *National Center for Biotechnology Information (NCBI)* annotiert. Der Polymorphismus mutierte eine Erkennungssequenz für das Restriktionsenzym *HinfI*. Der Restriktionsverdau des 395bp-langen PCR-Produktes von Exon 4 des Wildtyp-Allels erzeugte 4 Fragmente mit Längen von 183, 165, 24 und 23 bp. Dagegen entstanden bei dem Verdau des PCR-Produktes von Exon 4 des mutierten Allels mit *HinfI* nur 3 Fragmente mit Längen von 206, 165 und 24 bp. Der Polymorphismus konnte durch den Verdau in zwei von 200 gesunden Kontrollen identifiziert werden, wodurch wir eine Assoziation des Polymorphismus mit dem Phänotyp in Familie DCM-I ausschließen konnten.

NCBI SNP-ID ss#	Gen	Exon	DNA- Polymorphismus	Aminosäure- Polymorphismus
46566496	RINT-1	10	T1374C	Keine Auswirkungen
46566499	COG5	16	T1782G	Keine Auswirkungen
46566506	IPLA2	11	C1971A	Keine Auswirkungen
46566507	DOCK4	51	A5406G	Keine Auswirkungen
46566509	FLJ39575	2	A73G	Ile25Val
46566510	FLJ39575	4	C383T	Ser128Phe
46566512	PPP1R3A	4	T2419A	Leu807Ile
46566513	PPP1R3A	4	A2464G	Thr822Ala

Tabelle 4.7: Neue DNA-Polymorphismen in proteinkodierenden Exons der Kandidatengene, die noch nicht in der SNP-Datenbank *dbSNP* des *National Center for Biotechnology Information (NCBI)* annotiert waren und ihre Auswirkungen auf die Aminosäuresequenz.

¹³ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>

Wir haben alle proteinkodierenden Exons der 38 Gene, die innerhalb der minimalen Kandidatenregion lokalisiert waren, sequenziert. Als einzigen Polymorphismus, der mit dem Phänotyp in Familie DCM-I segregierte, konnten wir einen Basenpaaraustausch von Adenin zu Guanin an Position 100 (Nummerierung ausgehend vom Startkodon ATG, NM000108) in Exon 2 von DLD, das für die Dihydrolipoamid-Dehydrogenase (E3) kodiert, identifizieren (Abbildung 4.7). Der Basenpaaraustausch bewirkte einen Austausch von der polaren Aminosäure Threonin (Thr, T) zur hydrophoben Aminosäure Alanin (Ala, A) an Position 34 des Proteins (Abbildung 4.7). Bei der Sequenzanalyse von 438 Kontrollchromosomen konnten wir den Basenpaaraustausch A100G in keiner der Kontrollen detektieren. Auch bei einem Sequenzvergleich mit der Datenbank *dbSNP*¹⁴ des *National Center for Biotechnology Information (NCBI)* konnte der Polymorphismus A100G nicht identifiziert werden. Daher schlossen wir die Möglichkeit aus, dass es sich um einen seltenen auftretenden Polymorphismus handelte. Diese Daten machen es sehr wahrscheinlich, dass die Mutation T34A ursächlich für die DCM in dieser Familie ist und damit DLD als ein neues DCM-verursachendes Gen identifiziert werden konnte.

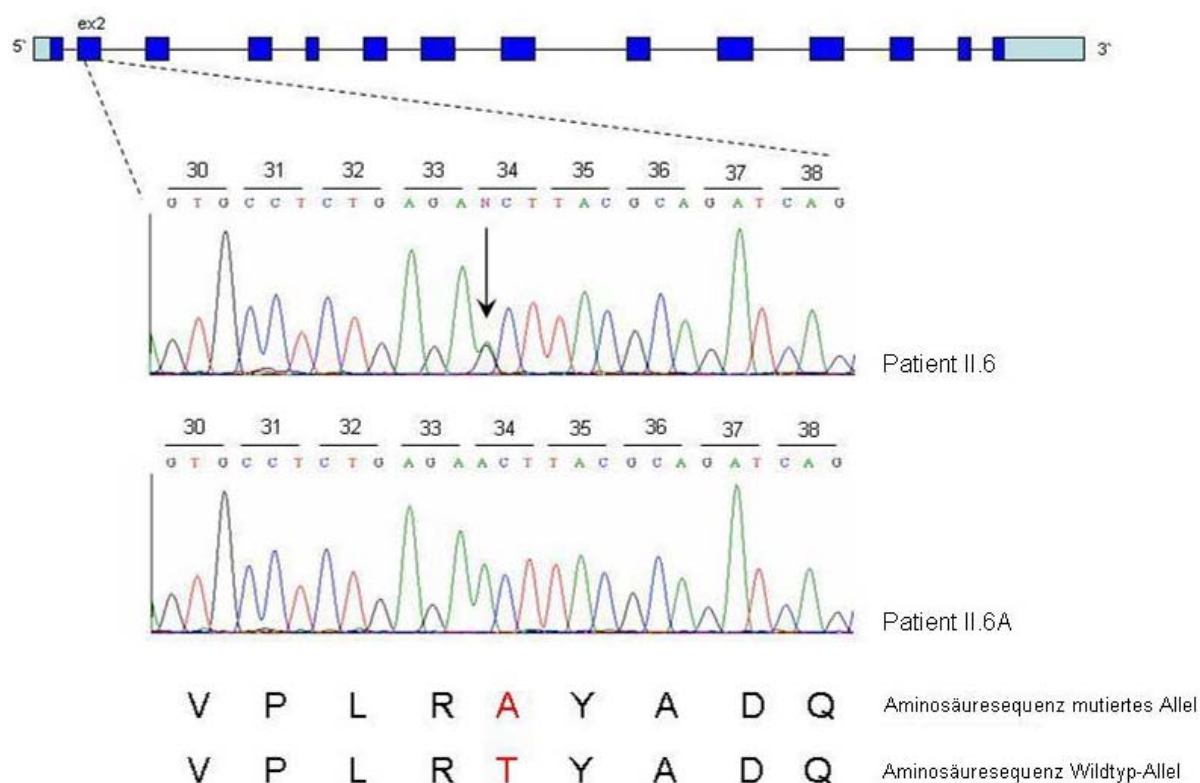


Abbildung 4.7: Mutation im DLD bei Familie DCM-I mit dilatativer Kardiomyopathie. Das DLD-Gen besteht aus 14 Exons, die sich über 20 kb auf Chromosom 7q31.1 erstrecken (oben). Ausgehend von genomischer DNA wurden die 12 Exons durch PCR amplifiziert und direkt sequenziert. In Exon 2 wurde ein Basenpaaraustausch von Adenin zu Guanin an Position 100 (A100G) identifiziert. Die Mutation führte zu einer Änderung der Aminosäure 34 von Threonin zu Alanin (Thr34Ala).

¹⁴ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>

4.1.4 Funktionelle Untersuchung der Mutation T34A im DLD

DLD kodiert für ein mitochondriales Protein, welches an verschiedenen Multienzymkomplexen beteiligt ist: am Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex (PDC), am α -Ketoglutarat-Dehydrogenase-Komplex (KDC), am *Branched-Chain* α -Ketosäure-Dehydrogenase-Komplex (BCKDC) und am Glycin-Abbau-System (GCS). Der PDC katalysiert die Dekarboxylierung von Pyruvat zu Acetyl-Coenzym A, welches dann als Ausgangsprodukt für den Zitratzyklus dient. Der KDC katalysiert im Zitratzyklus die Dekarboxylierung von α -Ketoglutarat zu Succinyl-CoA. BCKDC katalysiert einen irreversiblen Schritt im Metabolismus von Leucin, Isoleucin und Valin. Das GCS ist für die Synthese und Degradation von Glycin verantwortlich. Alle vier Multienzymkomplexe katalysieren also wichtige Reaktionen bei der Oxidation von Aminosäuren, Fettsäuren und Kohlenhydraten und nehmen eine zentrale Stellung im Energiemetabolismus der Zelle ein. Mit der Beteiligung an diesen Enzymkomplexen und aufgrund von Studien, die beschrieben, dass die Entwicklung von Kardiomyopathien von Störungen des mitochondrialen Energiemetabolismus begleitet wird, ist es durchaus wahrscheinlich, dass Mutationen im DLD zur Pathogenese der DCM beitragen können [Corbett et al. 1998] [Fountoulakis et al. 2004].

Ein Vergleich der Aminosäuresequenz der Dihydrolipoamid-Dehydrogenase verschiedener Spezies zeigte, dass das Threonin an Position 34 in der Evolution hochkonserviert war (Abbildung 4.8).

	1	34
Homo sapiens	MQSWSRVYCSLAKRGHFNRI SHGLQGLSAVPLR	TYADQP
Pongo pygmaeus	MQSWSRVYCSLAKRGHFNRI SHGLQGLSAVPLR	TYADQP
Macaca fascicularis	MQSWSRVYCSLAKRGHFNRI SHGLQGLSAVPLR	TYADQL
Mus musculus	MQSWSRVYRSLAKKGHFNRI SHGLQGVSSVPLR	TYADQP
Rattus norvegicus	MQSWSRVYCSLAKKGHFNRL SHGLQGASSVPLR	TYSDQP
Canis familiaris	MQSWSRVYCSLAKRGHFSRI SHGLQAVSAVPLR	TYADQP
Sus scrofa	MQSWSRVYCTLAKRGHFNRI AHGLQGVSAVPLR	TYADQP
Cricetulus griseus	MQSWSRVYCSLAKRGHFNRI SHGLQGVSSVPLR	TYADQP
Gallus gallus	MQRWGRVSCALARRSHFDRVHHGLQGGCAVPQR	TYADQ-

Abbildung 4.8: Vergleich von Proteinsequenzen der Dihydrolipoamid-Dehydrogenase verschiedener Spezies. Die in Familie DCM-I mutierte Aminosäure 34 ist rot markiert und in der Evolution hoch konserviert.

Die Mutation T34A änderte den vorletzten Aminosäurerest des 35bp-langen Signalpeptids der Dihydroliipoamid-Dehydrogenase. Diese Präsequenz am N-terminalen Ende ist essentiell für den spezifischen Transport der Proteine vom Zytoplasma in die Mitochondrien. Nach erfolgtem Import wird das Signalpeptid von einer Metalloprotease abgespalten. Aufgrund der Position der Mutation war anzunehmen, dass durch die Mutation möglicherweise der Transport des Proteins in die Mitochondrien betroffen sein könnte. Eine weitere mögliche Konsequenz der Mutation könnte die Inhibierung der Abspaltung des Signalpeptids sein, was wiederum die Faltung des E3-Proteins oder seine Wechselwirkung mit den anderen Komponenten der Multienzymkomplexe beeinträchtigen könnte.

Zuerst haben wir den Einfluss der Mutation auf die subzelluläre Lokalisation von DLD *in vivo* untersucht. Da für den Import von Proteinen in die Mitochondrien das Signalpeptid ausreichend ist, haben wir das 35bp-lange Signalpeptid von DLD vor das Reportergen GFP kloniert (Abbildung 4.9). Dazu wurde zuerst das GFP-Gen über die *Bam*HI- und *Eco*RI-Restriktionsschnittstellen in den Expressionsvektor *pcDNA3* (*Invitrogen*) kloniert (pcDNA-GFP). Anschließend haben wir das 35bp-lange Signalpeptid von DLD, ausgehend von der cDNA amplifiziert und über die *Kpn*I- und *Bam*HI-Schnittstellen am N-terminalen Ende des GFP eingefügt. Wir haben zwei verschiedene Konstrukte generiert. Erstens ein Konstrukt mit der Wildtypsequenz des Signalpeptids (DLD_SPwt-GFP) und zweitens ein Konstrukt, in dem das Signalpeptid die Mutation A100G enthielt (DLD_SPmut-GFP). Die Konstrukte wurden sequenziert, um die Sequenz der klonierten cDNA zu verifizieren und zusätzliche Mutationen auszuschließen.

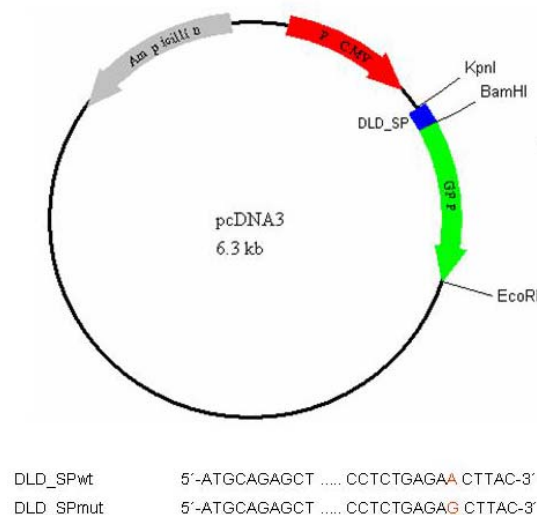


Abbildung 4.9: Klonierungsstrategie für das DLD-Signalpeptid (DLD_SP) und das GFP-Gen. Das GFP-Gen wurde zunächst über die BamHI- und die EcoRI-Schnittstelle in den *pcDNA3*-Expressionsvektor (*Invitrogen*) kloniert. Anschließend wurde das DLD_SP über die *Kpn*I- und die *Bam*HI-Schnittstelle vor das GFP-Gen kloniert. Erstens wurde ein Konstrukt mit der Wildtyp-Sequenz des Signalpeptides erzeugt (DLD_SPwt) und zweitens ein Konstrukt, in dem das Signalpeptid die Mutation A100G trug (DLD_SPmut).

Mit den Konstrukten DLD_SPwt-GFP, DLD_SPmut-GFP und pcDNA-GFP wurden humane SKOV-Zellen transfiziert und die Verteilung des GFP-Proteins in den Zellen nach 24 h mit dem Fluoreszenzmikroskop analysiert. Wie in Abbildung 4.10 zu sehen ist, war in den Zellen, die nur mit dem GFP-Protein (pcDNA-GFP) transfiziert wurden, das GFP-Protein diffus in den Zellen verteilt. Dagegen waren die Fusionsproteine DLD_SPwt-GFP und DLD_SPmut-GFP in punktuellen Kompartimenten konzentriert.

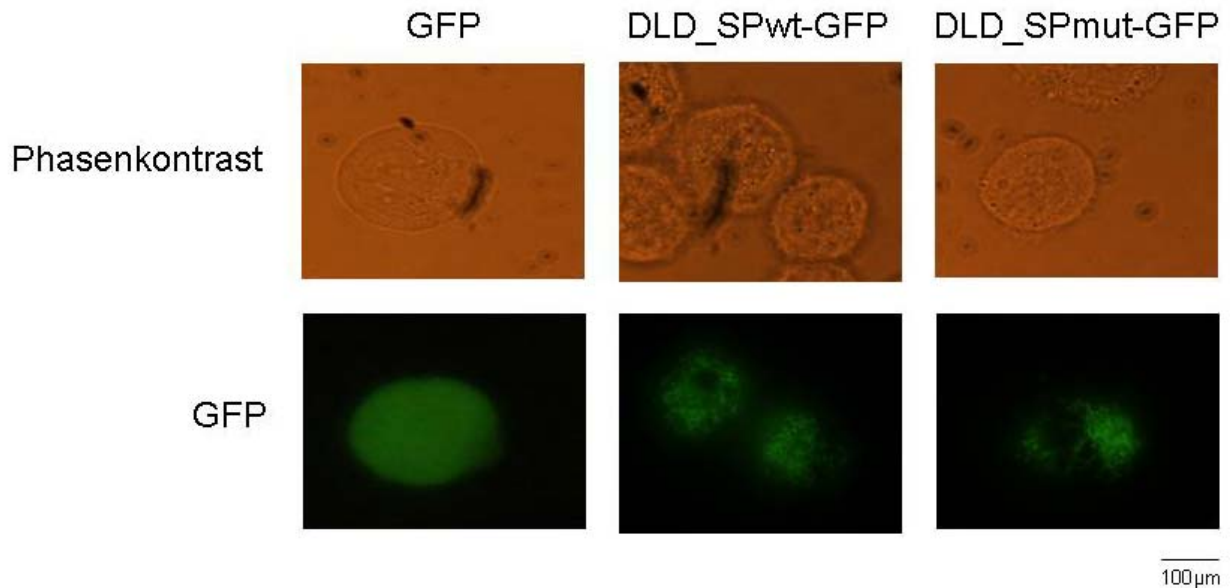


Abbildung 4.10: Lokalisation des GFP-Proteins durch Immunfluoreszenzmikroskopie in SKOV-Zellen, die entweder GFP exprimierten oder das Fusionsprotein DLD_SPwt-GFP bzw. DLD_SPmut-GFP. Nach 24 h wurde die Lokalisation der Proteine unter dem Fluoreszenzmikroskop dokumentiert. In den Kontrollzellen ist das GFP gleichmäßig in der gesamten Zelle verteilt. Dagegen ist in den Zellen, die eines der Fusionsproteine DLD_SPwt-GFP oder DLD_SPmut-GFP exprimierten, eine Lokalisation des GFP in den Mitochondrien zu beobachten. Das bedeutet, dass sowohl das Signalpeptid mit der Wildtyp-Sequenz als auch jenes mit der mutierten Sequenz den Transport von GFP in die Mitochondrien dirigieren kann.

Anschließend haben wir aus den transfizierten SKOV-Zellen die Mitochondrien isoliert und in einer Western-Blot-Analyse GFP mit dem Antikörper anti-GFP JL-8 (*Clontech*) detektiert. Als Kontrolle für die aufgetragenen Proteinmengen diente die endogene Dihydrolipoamid-Dehydrogenase. Im Homogenat der Zellen, die die Fusionsproteine DLD_SPwt-GFP und DLD_SPmut-GFP exprimierten, konnten wir zwei Banden identifizieren (Abbildung 4.11, Linie 1 + 2). Die obere schwächere Bande bei 31 kDa entsprach jeweils den Fusionsproteinen DLD_SPwt-GFP bzw. DLD_SPmut-GFP, während die untere Bande bei 27 kDa das prozessierte GFP-Protein repräsentierte, von dem nach dem Import in die Mitochondrien das Signalpeptid abgespalten wurde. In dem Gesamtzellextrakt war fast nur prozessiertes GFP-Protein und lediglich ein geringer Rest der Fusionsproteine DLD_SPwt-GFP oder DLD_SPmut-GFP nachweisbar. Passend dazu konnte eine deutliche Anreicherung des prozessierten GFP-Proteins in den Mitochondrien der Zel-

len, die die Fusionsproteine DLD_SPwt-GFP oder DLD_SPmut-GFP exprimierten, beobachtet werden. (Abbildung 4.11, Linie 4 - 6). Die zusätzliche Inkubation der Mitoplastenfraktion mit Proteinase K sollte die nur partiell importierten Proteine oder solche, die außen noch mit den Mitochondrien assoziiert waren, verdauen. Dagegen sollten die in die Mitochondrien importierten Proteine durch die Mitochondrienmembran vor einem Verdau geschützt sein. Tatsächlich war in den Zellen, die nur mit pcDNA-GFP transfiziert wurden, kein GFP mehr nachweisbar. Im Gegensatz dazu blieb die GFP-Menge in den Zellen, die das Fusionsprotein DLD_SPwt-GFP oder DLD_SPmut-GFP exprimierten, unverändert, dies im Vergleich zu der Mitochondrienfraktion ohne Behandlung mit ProteinaseK (Abbildung 4.11, Linie 7 - 9). Diese Ergebnisse der Fluoreszenzmikroskopie und der Western-Blot-Analyse zeigten, dass sowohl das Wildtyp-Signalpeptid als auch das mutierte Signalpeptid den Import des GFPs in die Mitochondrien dirigieren kann. Das GFP ohne DLD-Signalpeptid verbleibt dagegen im Zytoplasma. Auch gab es keine sichtbaren Unterschiede in der Prozessierung des Fusionsproteins nach dem Import zwischen dem Signalpeptid mit der Wildtypsequenz und dem Signalpeptid mit der Mutation T34A.

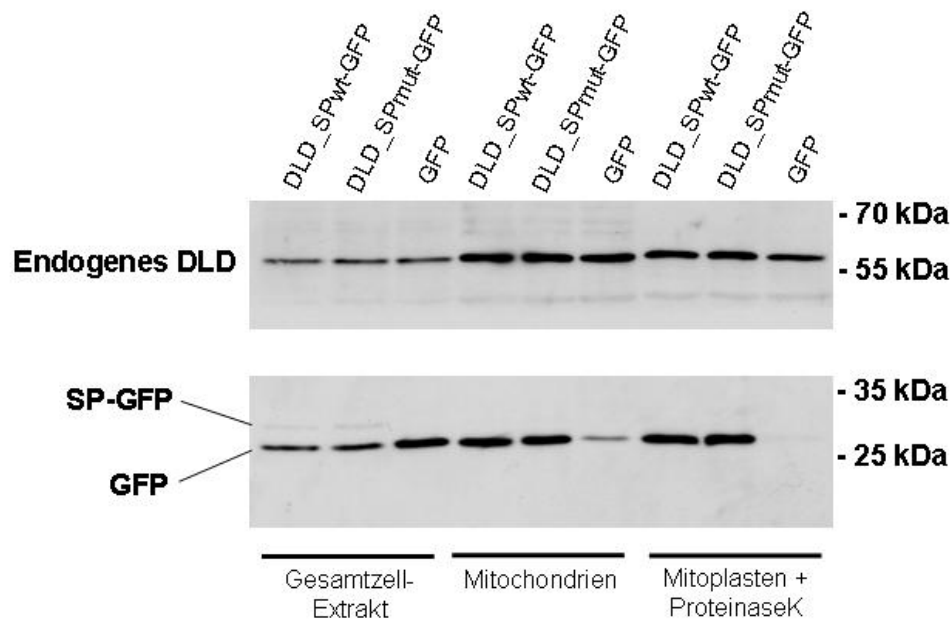


Abbildung 4.11: Lokalisation der Fusionsprotein DLD_SPwt-GFP und DLD_SPmut-GFP sowie GFP nach Transfektion und Expression in SKOV-Zellen. Die Western-Blot-Analyse zeigte im Homogenat der Zellen, die die Fusionsproteine DLD_SPwt-GFP und DLD_SPmut-GFP exprimierten, zwei Banden. Die obere schwächere Bande bei 31 kDa entsprach jeweils den Fusionsproteinen DLD_SPwt-GFP bzw. DLD_SPmut-GFP, während die untere Bande bei 27 kDa das prozessierte GFP-Protein repräsentierte, von dem nach dem Import in die Mitochondrien das Signalpeptid abgespalten wurde (Linie 1 - 3). Mitochondrien wurden durch Differentialzentrifugation isoliert. In der Mitochondrienfraktion ist eine deutliche Anreicherung der Fusionsproteine DLD_SPwt-GFP und DLD_SPmut-GFP zu beobachten (Linie 4 - 6). Nach Zerstörung der äußeren Mitochondrienmembran wurden die Proben zusätzlich noch mit Proteinase K verdaut (Linie 7 - 9). Die Fusionsproteine DLD_SPwt-GFP und DLD_SPmut-GFP sind vor dem Proteinase-Verdau geschützt, während das im Zytoplasma lokalisierte GFP-Protein vollständig verdaut wurde. Zur Detektion des GFP wurde der Antikörper JL-8 (*Clonetech*) verwendet. Als interne Ladungskontrolle wurde DLD mit dem Antikörper anti-Lipoamid-Dehydrogenase (*Rockland*) detektiert. Die Positionen der Molekulargewicht-Marker sind auf der rechten Seite angegeben.

Da die Mutation den Transport des Proteins in die Mitochondrien *per se* nicht veränderte, war die nächste Frage, ob die Mutation möglicherweise die Transportkinetik beeinflussen kann, d.h. ob der Transport des Proteins mit dem mutierten Signalpeptid beschleunigt oder verzögert wird. Dazu haben wir die Basenpaare 1 - 395 des DLD (gezählt vom Startkodon ATG, NM000108), ausgehend von der cDNA, amplifiziert und über die *HindIII*-Schnittstelle in den Expressionsvektor *pT7-Flag2* (*Sigma*) kloniert. Wir haben wieder zwei Konstrukte hergestellt – ein Konstrukt mit der Wildtypsequenz (DLDwt-Flag) und ein Konstrukt, das die Mutation A100G enthielt (DLDmut-Flag). Die Konstrukte wurden sequenziert, um die Sequenz der klonierten cDNA zu verifizieren und zusätzliche Mutationen auszuschließen. Die beiden Fusionsproteine DLDwt-Flag und DLDmut-Flag wurden in einem Retikulozyten-Lysat *in vitro* exprimiert und dabei durch Einbau von ^{35}S radioaktiv markiert. Im Translationsmix konnten wir nur die eine erwartete Bande bei 15 kDa detektieren, die den Fusionsproteinen DLDwt-Flag bzw. DLDmut-Flag entsprach (Abbildung 4.12, Linie 1 + 2). Um die Transportkinetik zu studieren, wurden die *in vitro* exprimierten Proteine mit frisch isolierten Mitochondrien im Transportpuffer gemischt und bei 27°C inkubiert. Nach 2 Minuten bzw. 10 Minuten wurde die Importreaktion durch Zugabe von Carbonyl-Cyanid m-Chlorophenylhydrazon (CCCP) inhibiert und die Mitochondrien reisoliert. In beiden Proben konnte nur eine Bande bei 15 kDa identifiziert werden (Abbildung 4.12, Linie 3 – 6). Nach Inkubation der Importreaktion mit Proteinase K, die alle nicht transportierten Proteine außerhalb der Mitochondrien verdauen sollte, war keines der beiden Fusionsproteine mehr zu detektieren (Abbildung 4.12, Linie 7 + 8). Das bedeutet, dass die beiden Fusionsproteine DLDwt-Flag und DLDmut-Flag zwar mit den Mitochondrien assoziiert waren, weil sie mit den Mitochondrien pelletiert wurden. Allerdings wurden die Fusionsproteine nicht in die Mitochondrien transportiert, was das Fehlen eines prozessierten Proteins und der komplette Verdau der Fusionsproteine durch Proteinase K zeigt.

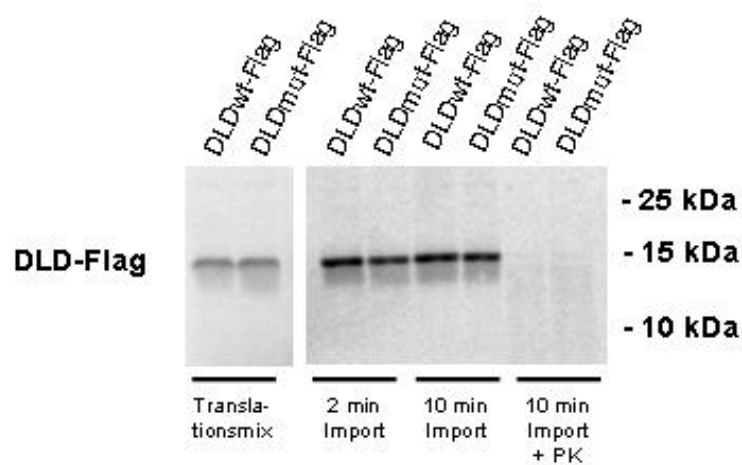


Abbildung 4.12: *In vitro* Import der Fusionsproteine DLDwt-Flag und DLDmut-Flag in Mitochondrien. Das Autoradiogramm zeigte im Translationsmix nur eine Bande bei 15 kDa (Linie 1 + 2). Auch nach 2 Minuten bzw. 10 Minuten Transportreaktion konnte nur eine Bande bei 15 kDa detektiert werden (Linie 3 – 6). Durch Inkubation der Transportreaktion mit Proteinase K wurden alle Fusionsproteine verdaut (Linie 7 + 8).

Zusätzlich zu der Analyse der Importreaktion wollten wir die Enzymaktivität der Dihydrolipoamid-Dehydrogenase in EBV-transformierten Lymphozyten der Patienten II.6 und II.8 (DLD^{T34A/+}) mit der in Lymphozyten von gesunden Kontrollpersonen (DLD^{+/+}) vergleichen. Wir haben zunächst Zellhomogenate aus DLD^{T34A/+} und DLD^{+/+} EBV-Lymphozyten auf einem 10 %igen Polyacrylamidgel aufgetrennt und in der anschließenden Western-Blot-Analyse DLD mit dem polyklonalen anti-Lipoamid-Dehydrogenase Antikörper (*Rockland*) detektiert. Wir konnten eine erwartete Bande bei 55 kDa identifizieren, die der Dihydrolipoamid-Dehydrogenase entsprach und belegen, dass die DLD-Expression in DLD^{T34A/+} und DLD^{+/+} gleich hoch war (Abbildung 4.13). Die Detektion von Prohibitin mit anti-Prohibitin (*Abcam*) zeigte, dass gleiche Mengen an Protein geladen wurden.

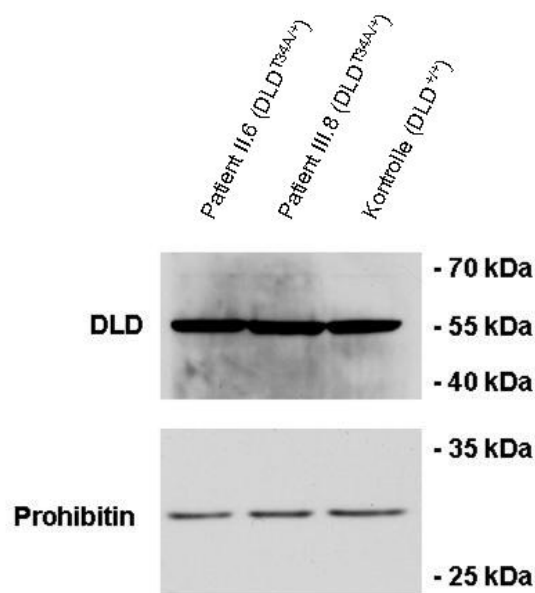


Abbildung 4.13: Expression von DLD in EBV-transformierten Lymphozyten DLD^{T34A/+} der Patienten II.6 und III.8 im Vergleich zu einer gesunden Kontrollperson (DLD^{+/+}). 10 µg Zellhomogenat wurden auf einem 10 % SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Zur Detektion des DLD wurde der polyklonale Antikörper anti-Lipoamid-Dehydrogenase (*Rockland*) verwendet. Als interne Ladungskontrolle wurde Prohibitin (*Abcam*) detektiert. Die Positionen der Molekulargewicht-Marker sind auf der rechten Seite angegeben. Die Western Blot Analyse bestätigte, dass es keine Unterschiede in der DLD-Expression zwischen Lymphozyten^{T34A/+} und Lymphozyten^{+/+} gibt.

Die Bestimmung der DLD-Aktivität erfolgte in Phosphatpuffer, der NAD⁺ und Dihydrolipoamid enthielt. Die Enzymaktivität konnte indirekt über die Reduktion von NAD⁺ zu NADH, die spektrophotometrisch als Veränderung der Absorption bei 340 nm messbar ist, ermittelt werden. Als interner Kontrollstandard wurde die Aktivität der Succinat-Dehydrogenase (SD) bestimmt, die im Zitratzyklus die Oxidation von Succinat zu Fumarat katalysiert. Dabei diente p-Iodonitrotetrazolium Violet (INT) als artifizieller Elektronenakzeptor, dessen Reduktion spektrophotometrisch bei 490 nm gemessen wurde. In Zellhomogenaten aus DLD^{T34A/+} und DLD^{+/+} EBV-Lymphozyten schwankten die absoluten DLD-Aktivitäten einzelner Individuen zwischen verschiedenen Assays, und auch bei DLD^{T34A/+} von verschiedenen Patienten gab es erhebliche Dif-

ferenzen in der Enzymaktivität. Insgesamt lagen die DLD-Aktivitäten in einem Bereich zwischen $80 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ und $140 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ und entsprachen damit in etwa dem Intervall ($43 - 109 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$), das von Hong et al. (1997) für Lymphozyten in einer Kontrollpopulation bestimmt wurde. Nach Normalisierung der DLD-Aktivität gegen die SD-Aktivität (DLD / SD) waren keine signifikanten Aktivitätsunterschiede zwischen $\text{DLD}^{\text{T34A/+}}$ und $\text{DLD}^{+/+}$ messbar (Abbildung 4.14). Aufgrund der erheblichen Schwankungen der DLD-Aktivität zwischen den einzelnen Individuen, die allerdings auch bei verschiedenen Personen innerhalb einer Kontrollpopulation beobachtet werden können, ließ sich keine verlässliche Aussage darüber machen, ob die Mutation einen Einfluss auf die Aktivität der Dihydrolipoamid-Dehydrogenase hat. Mit hoher Wahrscheinlichkeit wird die Aktivität der Dihydrolipoamid-Dehydrogenase aber nicht durch die Mutation T34A beeinflusst.

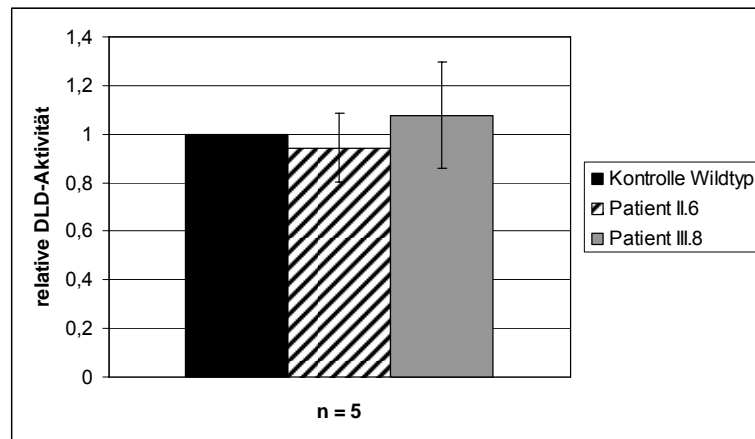


Abbildung 4.14: DLD-Enzymaktivität in EBV-transformierten Lymphozyten von Patient II.6 und III.8 im Vergleich zur Enzymaktivität in EBV-transformierten Lymphozyten einer gesunden Kontrolle. Die DLD-Enzymaktivität wurde gegen die Aktivität der Succinat-Dehydrogenase, einem Enzym aus dem Zitratzyklus, normalisiert. Es waren keine signifikanten Unterschiede in der Enzymaktivität zwischen $\text{DLD}^{\text{T34A/+}}$ (Patient II.6) und $\text{DLD}^{+/+}$ (Patient II.6A) messbar.

4.2 Kandidatengen-Analyse

4.2.1 Phänotypische Charakterisierung der Familie DCM-II

Wir haben eine deutsche Familie (Familie DCM-II) untersucht, bei deren erkrankten Familienmitgliedern dilatative Kardiomyopathie, Reizleitungsstörungen und Muskeldystrophie diagnostiziert wurden. Die Symptome traten zum einen isoliert auf und zum anderen konnten aber bei einzelnen Patienten auch mehrere Phänotypen gleichzeitig beobachtet werden. Darüber hinaus gab es Unterschiede in der Ausprägung eines Phänotyps zwischen verschiedenen Familienmitgliedern. Diese Kombination von Phänotypen wird häufig durch Mutationen im Gen für Lamin A/C (LMNA) verursacht [Genschel and Schmidt 2000]. Die Vererbung der Phänotypen in Familie DCM-II folgte einem autosomal-dominanten Erbgang (Abbildung 4.15).

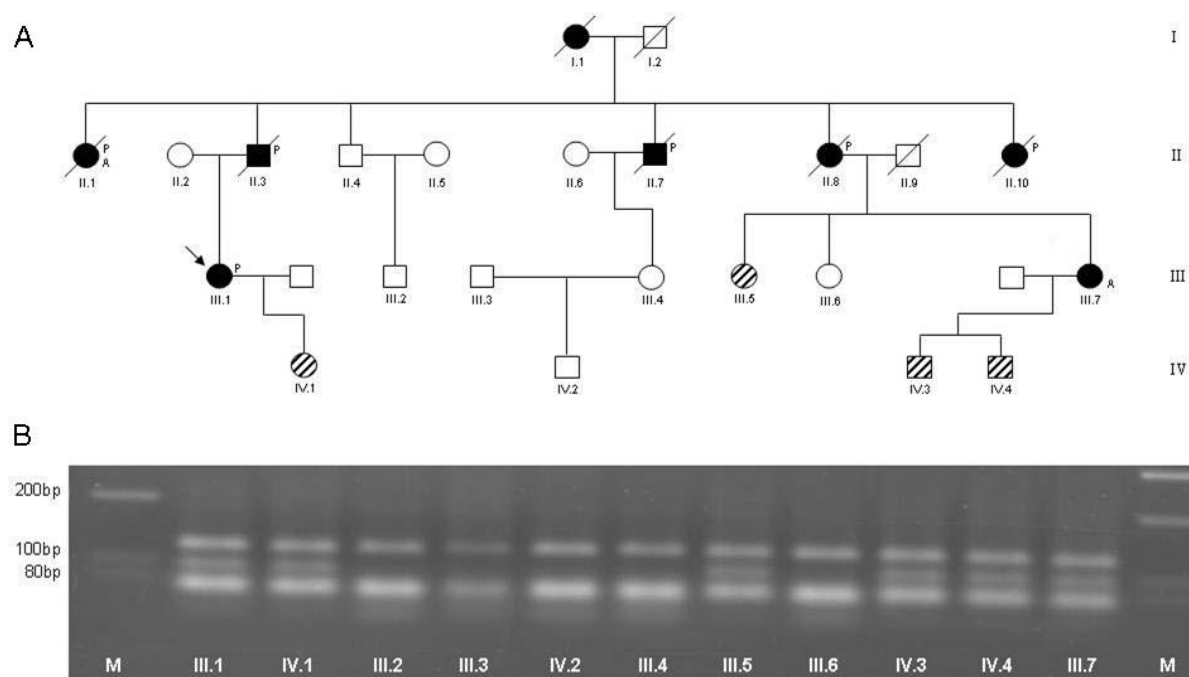


Abbildung 4.15: A: Stammbaum Familie DCM-II. Der Phänotyp wird autosomal-dominant vererbt. Ausgefüllte Symbole repräsentieren Patienten mit diagnostizierter DCM; offene Symbole repräsentieren gesunde Individuen und gestreifte Symbole Individuen ohne gesicherte Diagnose. Kreise symbolisieren Frauen und Quadrate Männer. P = Schrittmacher; A = Reizleitungsstörungen. B: Durch den Basenpaaraustausch mutierte eine Erkennungssequenz für das Restriktionsenzym *Sat I*. Der Verdau des PCR-Produktes von Exon 4 des Wildtyp-Allels erzeugte fünf Fragmente mit einer Länge von 33, 57, 62, 63 und 120bp, während der Verdau des mutierten Allels nur vier Fragmente mit einer Länge von 62, 63, 90 und 120bp erzeugte.

Bei der Indexpatientin III.1 wurden eine dilatative Kardiomyopathie und Gliedergürtel-Muskeldystrophie diagnostiziert. Bei der Patientin konnte ein vergrößerter linker Ventrikel, vergrößerte Vorhöfe sowie eine eingeschränkte Pumpfunktion des linken Ventrikels beobachtet wer-

den. Aufgrund permanenten Vorhofflimmerns musste bei der Patientin III.1 auch ein Schrittmacher implantiert werden. Die Implantation von Schrittmachern war auch bei fünf weiteren Familienmitgliedern (II.1, II.3, II.4, II.5, II.6) notwendig. Deutliche Reizleitungsstörungen wurden ebenfalls bei den Patienten III.5, III.7 und IV.1 diagnostiziert. Im Holter-EKG erschienen bei den Patienten III.5 und IV.1 supraventrikuläre Extrasystolen, die häufig ein Vorzeichen für Vorhofflimmern sind. Patientin III.7 erlitt im Rahmen von Vorhofflimmern einen Schlaganfall. Außerdem bestand bei den Patientinnen III.7 und IV.1 sowie bei den beiden Brüdern IV.3 und IV.4 der Verdacht auf Glieder-gürtel-Muskeldystrophie.

4.2.2 Mutationsscreening im Lamin A/C-Gen

Wegen des gemeinsamen Auftretens von dilatativer Kardiomyopathie, Reizleitungsstörungen und Muskeldystrophie sowie der hohen Prävalenz von Reizleitungsstörungen erschien es sinnvoll, das Lamin A/C-Gen als Kandidatengen nach krankheitsverursachenden Mutationen zu untersuchen. Dazu haben wir genomische DNA aus Lymphozyten der Indexpatientin III.1 isoliert. Ausgehend von der genomischen DNA wurden alle 12 proteinkodierenden Exons des LMNA einschließlich der jeweiligen Exon-Intron Grenzen durch PCR¹⁵ amplifiziert und direkt sequenziert. Dabei konnten wir bei der Indexpatientin III.1 einen Basenpaaraustausch von Cytosin nach Thymin an Position 700 (C700T) (ausgehend von ATG; NM170707) in Exon 4 identifizieren (Abbildung 4.16). Auf Proteinebene führte der Polymorphismus C700T zu einer Änderung des Codon 234 von Glutamin (CAG) zu einem vorzeitigen Stop-Codon (TAG).

Um zu zeigen, dass der Polymorphismus mit dem Phänotyp in der Familie segregierte, wurde ein Restriktionsverdau etabliert. Durch den Polymorphismus C700T mutierte eine Erkennungssequenz für das Restriktionsenzym *SatI*. Der Verdau des 335bp-langen PCR-Produktes von Exon 4 des Wildtyp-Allels mit *SatI* erzeugte fünf Fragmente mit Längen von 33, 57, 62, 63 und 120 bp. Dagegen entstanden bei dem Verdau des PCR-Produktes von Exon 4 des mutierten Allels mit *SatI* nur vier Fragmente mit Längen von 62, 63, 90 und 120 bp. Der Polymorphismus segregierte bei allen untersuchten Patienten mit kardialen und/oder muskulären Abnormalitäten (III.1, III.5, III.7; IV.1, IV.3, IV.4). Dagegen konnte der Polymorphismus bei keinem der untersuchten gesunden Familienmitglieder (III.2, III.3, III.4, III.6, IV.2) identifiziert werden (Abbildung 4.15). Auch in 360 Chromosomen von gesunden Kontrollpersonen konnte die Variante C700T nicht nachgewiesen werden. Ebenso war der Polymorphismus weder in der Literatur beschrieben, noch wurde er bei

¹⁵ Sequenzen der verwendeten Primer zur Amplifikation und Sequenzierung der Exons von LMNA: <http://genetics.med.harvard.edu/~seidman/primersequence.html>

einem Sequenzvergleich mit der NCBI-Datenbank *dbSNP*¹⁶, in der im Sommer 2006 (NCBI-Build 126) mehr als 12 Millionen SNPs registriert waren, gefunden. Diese Ergebnisse ließen es unwahrscheinlich erscheinen, dass der Basenpaaraustausch ein seltener vorkommender Polymorphismus war.

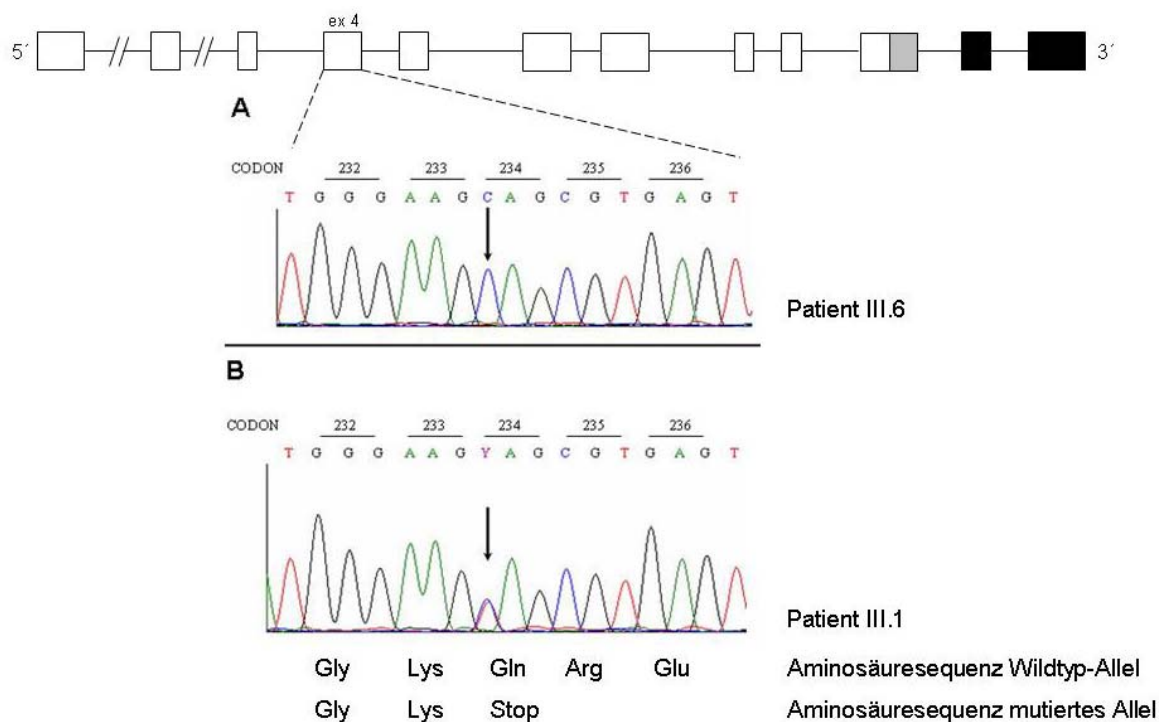


Abbildung 4.16: LMNA Mutation in Familie DCM-II. Oben: Das auf Chromosom 1 lokalisierte LMNA-Gen besteht aus 12 Exons. Die weiß unterlegten Exons kodieren für Lamin A und Lamin C, der letzte Teil von Exon 10 (grau) ist spezifisch für Lamin C, Exon 11 und 12 (schwarz) sind spezifisch für Lamin A. Ein Basenpaaraustausch von Cytosin nach Thymin an Position 700 (C700T) in Exon 4 des LMNA-Gens führt zur Insertion eines vorzeitigen Stop-Codons. A: Genomische Sequenz vom gesunden Familienmitglied III.6. B: Genomische Sequenz von Patientin III.1, bei der DCM und Gliedergürtel-Muskeldystrophie diagnostiziert wurden.

Die Mehrheit der im LMNA identifizierten Mutationen sind Missense-Mutationen. Bisher sind nur drei weitere Mutationen im LMNA beschrieben worden, die in der Insertion eines vorzeitigen Stop-Codons (PTC) resultieren. Allerdings wurde für keine dieser Mutationen beschrieben, welchen Einfluss das PTC auf die Struktur der Proteine oder die Stabilität der mRNA hat. PTCs können über verschiedene Mechanismen die Expression des Proteins beeinflussen. Erstens könnte ein trunkiertes Protein durch einen dominant-negativen Effekt auch die Funktion des verbleibenden Wildtyp-Proteins beeinträchtigen. Zweitens ist bekannt, dass ein vorzeitiges PTC die Stabilität der mRNA-Transkripte vermindern kann, da die fehlerhaften Transkripte von einem Kontrollmechanismus der Zelle (*nonsense-mediated mRNA decay*, NMD) erkannt und für einen raschen Abbau

¹⁶ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>

markiert werden. Drittens wurde beschrieben, dass PTCs einen alternativen Spleißvorgang (*nonsense-associated altered splicing*, NAS) induzieren können, indem die Mutation möglicherweise Sequenzen betrifft, die für die Definition der Exongrenzen notwendig sind. Als Folge des NAS kommt es zu einer Zunahme an alternativ gespleißten Transkripten [Vuoristo et al. 2004].

Als erstes haben wir die Möglichkeit untersucht, ob die Mutation einen alternativen Spleißvorgang initiiert. Die vier A-Typ Proteine – Lamin A, C, A δ 10 und C2 – entstehen durch alternatives Spleißen der mRNA eines Gens. Die beiden Hauptvarianten Lamin A und Lamin C unterscheiden sich im C-terminalen Bereich. Lamin C entsteht durch einen alternativen Spleißvorgang in Exon 10. Dementsprechend sind die Exons 11 und 12 spezifisch für Lamin A. Für die Analyse der mRNA-Transkripte haben wir RNA aus Lymphozyten der Indexpatientinnen III.1 und III.7, die heterozygot für die Mutation Q234X waren (LMNA^{Q234X/+}), isoliert. Die RNA wurde revers transkribiert und die LMNA cDNA durch PCR amplifiziert. Für die PCR kamen Primer zum Einsatz, die im ersten Exon und in Exon 12 des Gens lokalisiert waren, wodurch nur die Spleißvariante des Lamin A spezifisch amplifiziert wurde. Da tatsächlich nur das eine Fragment mit der erwarteten Größe von 2009 bp amplifiziert wurde, konnte ein alternativer Spleißvorgang als krankheitsverursachender Mechanismus ausgeschlossen werden (Abbildung 4.17).

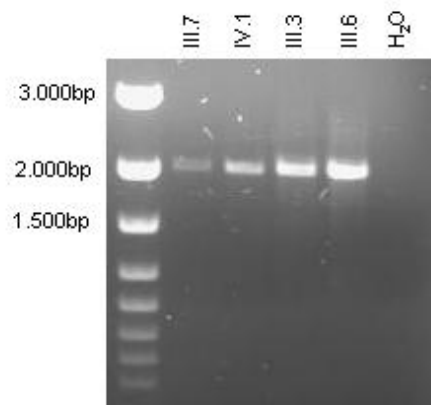


Abbildung 4.17: Amplifikation von Lamintranskripten aus Lymphozyten durch RT-PCR mit Primern, die in Exon 1 und Exon 12 des LMNA-Gens lokalisiert waren. Sowohl in den Kontrolllymphozyten LMNA^{+/+} der Patientinnen III.3 und III.6 als auch in den LMNA^{Q234X/+} Lymphozyten der Patienten III.7 und IV.1 konnte nur das erwartete 2009 bp lange Fragment identifiziert werden. Das Fehlen alternativer Spleißprodukte schloss NAS als Pathomechanismus aus.

Bei der anschließenden Sequenzanalyse des PCR-Produktes der Lamintranskripte konnten wir nur das Wildtyp-Allel mit Cytosin an Position 700 detektieren. Dagegen konnten wir die Sequenz des mutierten Allels mit Thymin an Position 700 nicht nachweisen (Abbildung 4.18 A). Die Sequenzanalyse ließ vermuten, dass *nonsense-mediated mRNA decay* als Pathomechanismus in Frage kommt. Um diese Möglichkeit zu untersuchen, haben wir eine Übernachtskultur von Lymphozyten der Indexpatientin III.1 und Patientin IV.1 angelegt. Am nächsten Tag wurden die Leukozyten für

8 Stunden entweder mit 100 µg/ml Cycloheximid bzw. 100 µg/ml Emetin inkubiert oder als Kontrolle mit H₂O. Cycloheximid blockiert die Translokation der Polypeptidkette und Emetin hemmt die Elongation der Polypeptidkette. Die Folge ist in beiden Fällen eine Hemmung der Proteinsynthese. Da aber die Funktionsfähigkeit der Translation für die Aktivierung des NMD notwendig ist, resultiert eine Hemmung der Proteintranslation dementsprechend auch in der Hemmung des NMD. Folglich können fehlerhafte mRNAs mit PTC nicht mehr abgebaut werden und akkumulieren im Zytoplasma. Nach der Inkubation mit Cycloheximid, Emetin oder H₂O haben wir aus den LMNA^{Q234X/+} Lymphozyten RNA isoliert und revers transkribiert. Anschließend wurde die LMNA cDNA mit Primern, die in Exon 3 und Exon 6 lokalisiert waren, durch PCR amplifiziert und direkt sequenziert. Tatsächlich war in den LMNA^{Q234X/+} Lymphozyten nach Inkubation mit Cycloheximid oder Emetin das mutierte Allel bei der Sequenzanalyse der LMNA-Transkripte nachweisbar (Abbildung 4.18C + 4.18D). Das mutierte Allel wurde also nach Hemmung des NMD nicht mehr abgebaut. Dagegen konnte in den LMNA^{Q234X/+} Lymphozyten, die mit H₂O behandelt wurden, nur die Sequenz des Wildtyp-Allels identifiziert werden (Abbildung 4.18B). Dieses Ergebnis zeigte, dass die NMD-Maschinerie die Transkripte des mutierten Allels tatsächlich erkennen kann und zu deren Abbau führt.

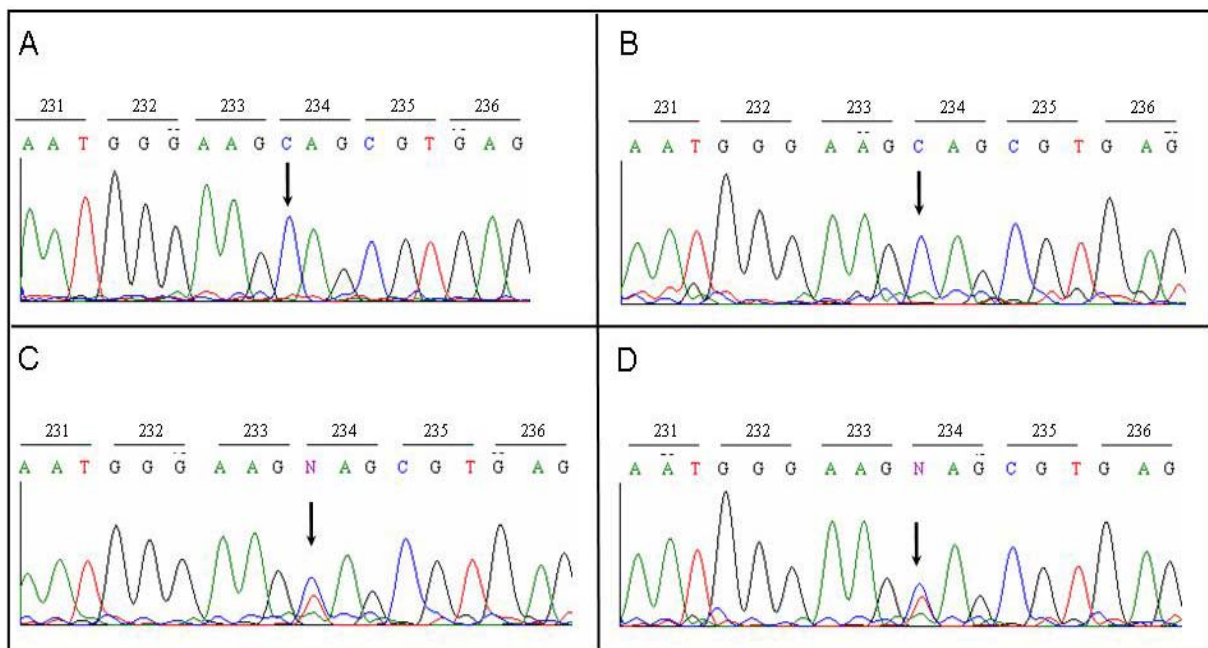


Abbildung 4.18: Detektion des mutierten Allels nach Hemmung des NMD. Bei der Sequenzanalyse der Lamintranskripte aus LMNA^{Q234X/+} Lymphozyten konnten wir nur das Wildtyp-Allel mit Cytosin an Position 700 detektieren, nicht aber die Sequenz des mutierten Allels mit Thymin an Position 700 (A). Frisch isolierte LMNA^{Q234X/+} Lymphozyten wurden über Nacht kultiviert und für 8 h mit H₂O (B), 100 µg/ml Cycloheximid (C) oder 100 µg/ml Emetin (D) inkubiert. Aus den Lymphozyten isolierte RNA wurde in cDNA umgeschrieben, die Lamintranskripte durch PCR amplifiziert und anschließend sequenziert. Nach Inhibition der Translation und dementsprechend auch des NMD konnte das mutierte Allel in den LMNA^{Q234X/+} Lymphozyten wieder detektiert werden.

Da nur die Transkripte des Wildtyp-Allels in der Zelle stabil sind, sollte in LMNA^{Q234X/+} Zellen dementsprechend die Anzahl der LMNA-Transkripte und die Menge an Laminproteinen reduziert sein. Die Quantifizierung der Lamintranskripte und die Quantifizierung der Proteinexpression erfolgte in Hautfibroblasten und nicht in Lymphozyten, weil die A-Typ Lamine hauptsächlich in differenzierten Epithelzellen (Bindegewebs-Fibroblasten) exprimiert werden, während die Expression der A-Typ Lamine in undifferenzierten und proliferierenden Zellen (inflammatorische Zellen, Lymphozyten) stark reduziert ist [Broers et al. 1997]. Bei der Western-Blot-Analyse von Zellhomogenaten aus Lymphozyten konnten wir keines der beiden Laminproteine (Lamin A und Lamin C) detektieren.

Die Quantifizierung der LMNA-Transkripte in LMNA^{Q234X/+} Hautfibroblasten von Patientin IV.1 erfolgte durch eine *Real-Time-PCR*. Dazu wurde die RNA aus den Hautfibroblasten isoliert und revers transkribiert. Nach Synthese der cDNA wurden die Proben durch *Real-Time-PCR* mit dem *LightCycler® 2.0 System (Roche)* analysiert. Für die Amplifikation der Lamintranskripte wurde der *TaqMan Gene Expression Assay HS00153462 (Applied Biosystems)* verwendet. Die Sonde war am Übergang zwischen Exon 2 und Exon 3 lokalisiert, was gewährleistete, dass nur LMNA cDNA, aber keine genomische DNA amplifiziert werden konnte. Als interner Kontrollstandard wurde die ubiquitär exprimierte 5-Aminolevulinat-Synthase (ALAS1) mit dem *LightCycler h-ALAS House-keeping Gene Set (Roche)* detektiert. Die Expression von LMNA wurde gegen die interne Kontrolle ALAS1 normalisiert. Die relative LMNA-Expression in den Hautfibroblasten LMNA^{Q234X/+} war deutlich reduziert und betrug nur 66 % der relativen LMNA-Expression in Fibroblasten LMNA^{+/+} einer gesunden Kontrollperson (Abbildung 4.19).

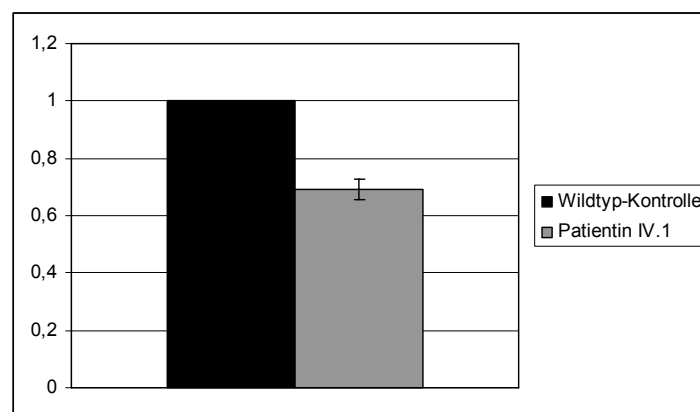


Abbildung 4.19: Analyse der Menge an Lamintranskripten in kultivierten Hautfibroblasten LMNA^{Q234X/+} von Patientin IV.1 mit *Real-Time-PCR*. Als interne Kontrolle diente ALAS1 (*Roche*). Die Laminexpression ist bei Patientin IV.1 deutlich reduziert im Vergleich zur Kontrolle.

Die verringerte Anzahl an mRNA-Transkripten, bedingt durch den Abbau der PTC-kodierenden Transkripte, sollte schlussendlich zu einer Verringerung der Proteinexpression führen. Um diese

Hypothese zu bestätigen, wurden Zellhomogenate aus kultivierten LMNA^{Q234X/+} Hautfibroblasten von Patientin IV.1 und einer gesunden Kontrollperson (LMNA^{+/+}) auf einem 8 %igen Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die anschließende Western-Blot-Analyse erfolgte mit dem monoklonalen anti-Lamin Antikörper JoL5 (*abcam*), der gegen die N-terminale Domäne (Aminosäurereste 1 – 171) des Proteins gerichtet ist. Mit diesem Antikörper können auch C-terminal trunkierte Laminproteine detektiert werden. Zwei Banden bei 74 kDa und 64 kDa, die Lamin A bzw. Lamin C entsprachen, konnten identifiziert werden (Abbildung 4.20). Es wurde die gleiche Menge an Proteinen geladen, was die Detektion von β -Aktin zeigte. In LMNA^{Q234X/+} Hautfibroblasten war die Menge sowohl von Lamin A als auch von Lamin C tatsächlich deutlich reduziert, dies im Vergleich zu den Proteinnengen in Wildtyp-Fibroblasten (Abbildung 4.20). Darüber hinaus konnte in den LMNA^{Q234X/+} Hautfibroblasten der Patientin IV.1 auch kein potentiell trunkiertes Protein bei 27 kDa detektiert werden (Abbildung 4.20). Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass eine Haploinsuffizienz von Lamin A und Lamin C, ausgelöst durch den Abbau der mutierten mRNA durch NMD, als Pathomechanismus für DCM in Frage kommt.

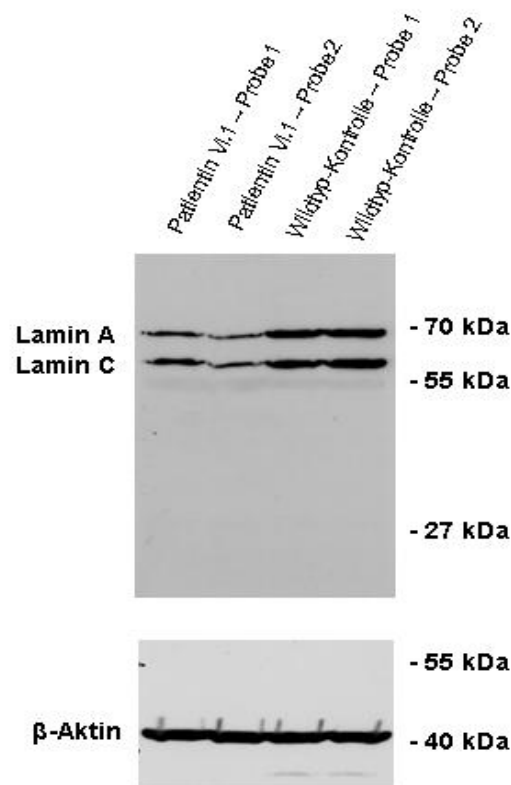


Abbildung 4.20: Expression von Lamin A und Lamin C in kultivierten Hautfibroblasten LMNA^{Q234X/+} von Patientin IV.1 im Vergleich zu einer gesunden Kontrollperson LMNA^{+/+}. 20 μ g Zellhomogenat wurden auf einem 8 % SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Zur Detektion der Laminproteine wurde der Antikörper JoL5 (*Abcam*) verwendet, der gegen die ersten 171 Aminosäuren am N-terminalen Ende gerichtet ist. Als interne Ladungskontrolle wurde β -Aktin mit dem Antikörper I-19 (*Santa Cruz*) detektiert. Die Positionen der Molekulargewicht-Marker sind auf der rechten Seite angegeben. Die Western-Blot-Analyse bestätigte, dass in den Hautfibroblasten LMNA^{Q234X/+} die Expression von Lamin A und Lamin C deutlich reduziert war (A). Darüber hinaus konnte auch kein potentiell trunkiertes Protein bei 27 kDa detektiert werden.

Es ist bekannt, dass LMNA-Mutationen die Stabilität der Kernmembran verringern und dadurch gerade Nuklei in Geweben mit hoher mechanischer Belastung, wie im Myokardium oder in der Skelettmuskulatur, zerstört werden (Broers et al. 2004).

Wir haben die Folgen der Mutation Q234X auf die Morphologie des Nukleus und die Stabilität der Kernmembran untersucht. Abnormale Strukturen der Kernmembran wurden von Nikolova et al. (2004) in Kardiomyozyten von LMNA^{+/-} Mäusen beschrieben sowie von Muchir et al. (2004) in Fibroblasten von Patienten mit Missense-Mutationen im LMNA. Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Kernen aus LMNA^{Q234X/+} Hautfibroblasten zeigten allerdings keine auffälligen morphologischen Veränderungen der Kernmembran oder eine Fehlverteilung der Kernporen (Abbildung 4.21).

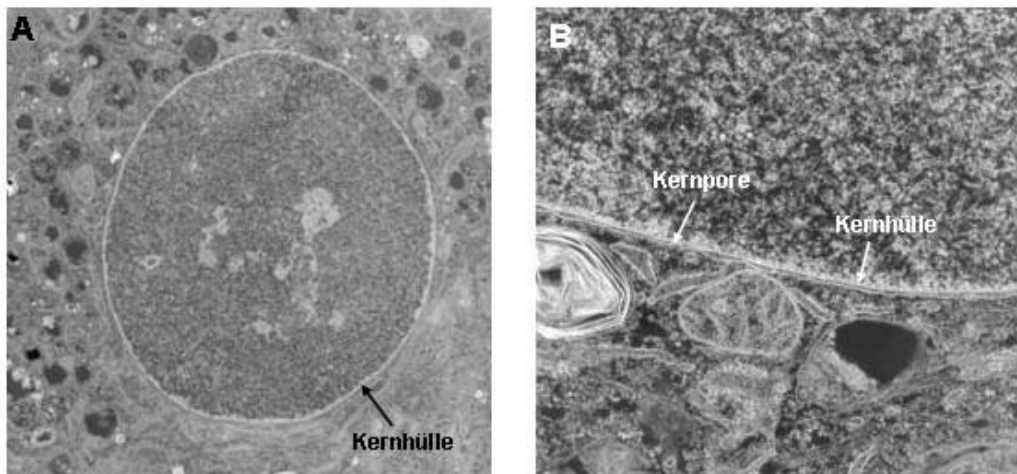


Abbildung 4.21: Elektronenmikroskopische Aufnahmen eines Nukleus aus LMNA^{Q234X/+} Fibroblasten. A: Diese Aufnahme zeigt einen Schnitt durch einen Nukleus. Es sind keine morphologische Veränderungen der Kernhülle oder eine Erweiterung des Intermembranraumes zu erkennen. B: Diese Aufnahme zeigt einen vergrößerten Ausschnitt der Kernhülle und eine Kernpore.

5 Diskussion

5.1 Positionelle Klonierung eines neuen DCM-Gens

Die familiäre dilatative Kardiomyopathie ist eine genetisch heterogene Herzerkrankung mit hoher Sterblichkeitsrate, gekennzeichnet durch eine Vergrößerung des linken Ventrikels und einer Verminderung der Pumpleistung. Mit Hilfe molekulargenetischer Methoden wurden mittlerweile zwanzig Gene und zehn weitere chromosomale Loci identifiziert, die ursächlich für eine primäre DCM sein können. Pathologische Mutationen in Zytoskelettproteinen, wie z.B. im Dystrophin, im δ -Sarcoglykan und Desmin oder in Proteinen des Sarkomers, wie z.B. im Aktin und Myosin, führten zu der Hypothese, dass eine Beeinträchtigung der Kraftübertragung oder eine reduzierte Kraftentwicklung die Entstehung der DCM begünstigen. Allerdings scheint dies eine etwas vereinfachte Sichtweise zu sein, da darüber hinaus auch Mutationen in Proteinen gefunden wurden, wie z.B. im Lamin A/C- oder EYA4-Gen, die auf den ersten Blick nicht dem kraftübertragenden Zytoskelett zuzuordnen sind und deren Funktion in der Pathophysiologie der DCM noch nicht geklärt ist. Die Zahl der bisher identifizierten Gendefekte zeigt, wie vielfältig die Mechanismen sind, die zu einer dilatativen Kardiomyopathie führen können.

Wir haben eine Familie (DCM-I) mit familiärer dilatativer Kardiomyopathie untersucht, in der 16 Mitglieder in drei Generationen erkrankt waren. Nach Ausschluss aller Gene und Loci, die bisher für familiäre Formen der DCM bekannt waren, lokalisierten wir in einer genomweiten Kopplungsanalyse einen neuen krankheitsverursachenden Locus auf dem langen Arm von Chromosom 7 mit einem maximalen LOD-Score von $Z = 4,20$ bei $\theta = 0,00$ für die Marker D7S471 und D7S501. Durch Feinkartierung und Haplotypenanalyse ließ sich die Kandidatenregion auf 10 Mb zwischen den Markern D7S2545 und D7S2554 eingrenzen, die mit keiner bisher beschriebenen Kandidatenregion für DCM überlappte.

In dem Intervall waren keine Zytoskelettproteine oder Proteine des Sarkomers annotiert. Anhand von funktionellen Daten, Tiermodellen oder bekannten humanen Krankheitsbildern haben wir von den in der Kandidatenregion annotierten Genen eine Prioritätsliste erstellt. So waren in dem Intervall die Gene für Laminin beta-1 (LAMB1) und Laminin beta-4 (LAMB4) lokalisiert. Da Laminine ein Bestandteil der extrazellulären Matrix sind, könnten Mutationen in diesen Genen die Kraftübertragung beeinträchtigen. Für die Phosphoinosit-3-Kinase (PIK3CG) konnte gezeigt werden, dass sie die Kontraktilität von Kardiomyozyten negativ beeinflusst [Crackower et al. 2002]. Auch Transkriptionsfaktoren wie die in der Kandidatenregion kodierten HBPI, ZNF277 und FOXP2 könnten zur Pathophysiologie der DCM beitragen, wie Schönberger et al. für den transkriptionellen Koaktivator EYA4 zeigen konnten. Weitere interessante Gene in der minimalen Kandidatenregion

waren die im Energiemetabolismus involvierten Gene DLD und IPLA2, da mittlerweile mehrere Studien gezeigt haben, dass bei Kardiomyopathien auch Veränderungen im Energiemetabolismus der Zelle zu beobachten sind [Corbett et al. 1998] [Fountoulakis et al. 2004].

Durch Sequenzanalyse der proteinkodierenden Exons aller Kandidatengene gelang es eine Mutation im zweiten Exon des Gens für die Dihydrolipoamid-Dehydrogenase (DLD) zu identifizieren. Die Mutation verursacht einen Basenpaaraustausch von Adenin zu Guanin an Position 100 der mRNA (Nummerierung ausgehend vom Startkodon ATG, NM000108). Diese Variante bewirkt auch eine Änderung der Aminosäuresequenz an Position 34 von Threonin zu Alanin (T34A). Ein Vergleich der Aminosäuresequenzen mit anderen Spezies zeigte, dass das Threonin während der Evolution hoch konserviert ist.

DLD kodiert für ein mitochondriales Protein, welches an verschiedenen Multienzymkomplexen partizipiert. Zu den Komplexen zählt der im Metabolismus der verzweigtkettigen Aminosäuren involvierte *Branched-Chain- α -Ketosäure-Dehydrogenase-Komplex* (BCKDC) und zwei Komplexe, die Reaktionen des Zitratzyklus katalysieren – der Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex (PDC) und der α -Ketoglutarat-Dehydrogenase-Komplex (KDC). Mit der Beteiligung an diesen beiden Enzymkomplexen, die an der Oxidation von Glukose und Fettsäuren beteiligt sind, nimmt DLD eine wichtige Stellung im Energiemetabolismus der Zelle ein, insbesondere im adulten Myokard, in dem die Energiegewinnung fast vollständig von der Oxidation von Fettsäuren und Glukose abhängt. Die Bedeutung von DLD für den oxidativen Metabolismus zeigte sich im Tiermodell. Mäuse, denen das DLD komplett fehlte (DLD^{-/-}), starben schon vor der Geburt. Im Gegensatz zu den DLD^{-/-}-Mäusen erschienen heterozygote Tiere (DLD^{+/-}) phänotypisch normal [Johnson et al. 1997], trotz verringerter Aktivität aller Enzymkomplexe, an denen DLD beteiligt ist. Allerdings sind die DLD^{+/-}-Tiere nicht über einen längeren Zeitraum beobachtet worden, erhöhten körperlichen Belastungen ausgesetzt worden oder speziell auf kardiale Phänotypen untersucht worden.

Die Erforschung der Pathophysiologie von dilatativer Kardiomyopathie hat sich hauptsächlich auf die mechanischen Aspekte wie Krafterzeugung und Kraftübertragung konzentriert. Die Rolle des Energiemetabolismus während der Entwicklung von DCM hat dagegen bisher wenig Beachtung gefunden [Carvajal and Moreno-Sanchez 2003]. Dabei verursachen Störungen des Energiemetabolismus oder der ATP-Produktion eine Reihe neuromuskulärer Krankheitsbilder. Mutationen in Enzymen der Atmungskette können Ursache für die Entwicklung des Leigh-Syndroms sein, dessen klinisches Bild von Hypotonie, Krämpfen und Verzögerungen in der Entwicklung geprägt ist [Leonard and Schapira 2000]. Mutationen im Gen ATP6, einer Untereinheit der mitochondrialen ATP-Synthase, sind assoziiert mit dem NARP-Syndrom, für das Neuropathie, Ataxie und Retinitis Pigmentosa charakteristisch sind [Holt et al. 1990]. Auch bei kardiovaskulären Krankheiten wurden

morphologische Abnormalitäten der Mitochondrien beschrieben und damit einhergehend Defizite in der Energieproduktion. Die reduzierte Energieproduktion führt sekundär dann zu Funktionsstörungen verschiedener anderer zellulärer Prozesse, die kritisch für die kardiale Pumpfunktion sind, wie der Ca^{2+} -Transport oder die Kontraktion der Sarkomerproteine [Huss and Kelly 2005]. So wurden bei hypertropher oder dilatativer Kardiomyopathie Zellen mit einer erhöhten Mitochondrienanzahl beobachtet oder Mitochondrien mit einer verringerten Größe und strukturellen Veränderungen der Membran [Ventura-Clapier et al. 2004].

In Studien an Mäusen wurden Korrelationen zwischen dilatativer Kardiomyopathie und Änderungen im Energiemetabolismus beschrieben. Mäuse mit einer herzspezifischen homozygoten Deletion des Transkriptionsfaktors Tfam, der für die Proliferation der Mitochondrien essentiell ist, weisen eine Reduktion der respiratorischen Kapazität auf. Das Resultat ist ein Ungleichgewicht zwischen Energieproduktion und Energieverbrauch und eine verringerte Leistungsfähigkeit des Herzens, was zu einer Entwicklung von dilatativer Kardiomyopathie bei den Tfam^{-/-}-Mäusen führt [Li et al. 2000]. Fountoulakis et al. (2004) verglichen das mitochondriale Proteom von Wildtyp-Mäusen mit jenem von Desmin-defizienten Mäusen, die DCM entwickelten. Dabei konnten signifikante Änderungen im Acetat-Metabolismus, bei NADH-Transportproteinen, im Aminosäuremetabolismus und in Proteinen der Atmungskette identifiziert werden. Auch die Aktivität der Dihydrolipoamid-Dehydrogenase war in den Desmin-defizienten Mäusen auf 70 % des Wertes in Wildtyp-Tieren verringert. Ähnliche Verringerungen in der Expression von Genen, die in der Energieproduktion involviert sind, inklusive der Dihydrolipoamid-Dehydrogenase, wurden auch in Herzen von DCM-Patienten beschrieben [Corbett et al. 1998]. Aufgrund dieser Ergebnisse und seiner zentralen Stellung im Energiemetabolismus der Zelle ist DLD ein plausibles Kandidatengen, in dem Mutationen durchaus zur Pathogenese der DCM beitragen können.

DLD ist im Kerngenom kodiert und muss daher nach der Proteintranslation gezielt in die Mitochondrien transportiert werden. Dafür trägt DLD eine Präsequenz am N-terminalen Ende, die den Import des Proteins in die Mitochondrien dirigiert und nach dem Transport durch Proteasen abgespalten wird. Die Mutation T34A betrifft den vorletzten Aminosäurerest dieses 35bp-langen Signalpeptids der Dihydrolipoamid-Dehydrogenase (Abbildung A.16). Aufgrund der Position der Mutation wollten wir die Hypothese testen, ob die Mutation den Transport des Proteins in die Mitochondrien beeinträchtigt, oder ob die Prozessierung des Signalpeptides betroffen sein könnte. Dazu haben wir den Import zunächst anhand von Fusionsproteinen studiert, bei denen entweder das Wildtyp-Signalpeptid (DLD_SPwt-GFP) oder das Signalpeptid mit der Mutation T34A (DLD_SPmut-GFP) vor das Reportergen GFP kloniert wurde. Beide Fusionsproteine wurden nach Transfektion und Expression in SKOV-Zellen in die Mitochondrien transportiert und das Signal-

peptid normal prozessiert. Der Import des Proteins in die Mitochondrien scheint also *per se* nicht beeinträchtigt zu sein.

Außerdem haben wir die Auswirkung der Mutation auf die Enzymaktivität der Dihydrolipoamid-Dehydrogenase (E3) in Lymphozyten der Patienten II.6 und III.8 (DLD^{T34A/+}) untersucht. Wir konnten keine Verminderung der Aktivität der Dihydrolipoamid-Dehydrogenase in DLD^{T34A/+} gegenüber DLD^{+/+} nachweisen. Allerdings sind Lymphozyten als Modellsysteme nicht optimal geeignet, um die spezifischen Anforderungen in Kardiomyozyten unter extremen körperlichen Stresssituationen zu simulieren. So beschrieben Grafakou et al. (2003) einen Jungen mit Leigh-Syndrom, der Mutationen in beiden Allelen des DLD trug. Die Aktivität der Dihydrolipoamid-Dehydrogenase und des Pyruvat-Dehydrogenase Komplexes waren im Muskelgewebe dieses Jungen auf 29 % bzw. auf 14 % der Kontrollwerte reduziert. Dagegen war die Aktivität des Pyruvat-Dehydrogenase-Komplexes in den Fibroblasten des Jungen normal. Ähnliche Ergebnisse beschrieben Kirby et al. (1999), die mehrere Defekte in Enzymen der Atmungskette in Skelettmuskelzellen diagnostizierten. Allerdings konnten sie nur ungefähr die Hälfte dieser Enzymdefekte auch in kultivierten Fibroblasten nachweisen. Das bedeutet, dass eine mögliche Änderung in der Enzymaktivität der Dihydrolipoamid-Dehydrogenase nicht diagnostiziert werden kann, wenn nicht Gewebe analysiert wird, in dem auch pathologische Veränderungen zu beobachten sind. Da Kardiomyozyten ganz spezielle Funktionen haben und bei körperlicher Belastung auch großen Stresssituationen ausgesetzt sind, wäre es insbesondere bei Kardiomyopathien wichtig, das Verhalten der Enzyme in dem betroffenen Gewebe untersuchen zu können. Aufgrund der engen Korrelation zwischen der oxidativen Kapazität der Mitochondrien und der Arbeitsleistung des Herzens könnte schon ein minimales Ungleichgewicht in der ATP-Produktion genügen, um in extremen Stresssituationen die Pumpleistung des Myokards zu limitieren. Über einen längeren Zeitraum betrachtet könnten die dadurch ausgelösten kompensatorischen Mechanismen aber pathologische Veränderungen im Herzen verursachen. In unserem Fall wäre die Bestimmung der Enzymaktivität in Kardiomyozyten nur mit sehr schwer zu erhaltenen Herzbiopsien möglich gewesen. Ein Ausweg könnte die Erzeugung einer *Knock-in* Maus mit der Mutation T34A im DLD sein und die anschließende Analyse der Konsequenzen der Mutation für das Mäuseherz. Allerdings ist es unwahrscheinlich, dass die Mutation T34A einen Einfluss auf die Enzymaktivität der Dihydrolipoamid-Dehydrogenase hat. Da die Mutation im Signalpeptid lokalisiert ist und weder den Import noch die Abspaltung des Signalpeptides beeinträchtigt, sollte die Faltung des Proteins oder seine Wechselwirkungen mit den anderen Komponenten der Multienzymkomplexe nicht gestört sein.

Die bisher beim Menschen identifizierten Mutationen im DLD verursachen eine Reihe neurologischer Phänotypen wie Mikrocephalie oder das Leigh-Syndrom, allerdings wurde bei keinem der Patienten eine dilatative Kardiomyopathie diagnostiziert. Bei der genetischen Analyse dieser Pa-

tienten zeigte sich, dass es sich grundsätzlich um rezessive Erkrankungen handelte. Bei allen Betroffenen waren beide Allele des DLD mutiert (*compound heterozygot*) und die Enzymaktivität der Dihydrolipoamid-Dehydrogenase war deutlich reduziert. Im Gegensatz dazu ist die von uns beschriebene Mutation T34A eine dominante Mutation, da wir keine weitere Mutation im DLD identifizieren konnten und die Proteinexpression in DLD^{T34A/+} Lymphozyten identisch war mit der DLD-Expression in Wildtyp-Lymphozyten.

Das Fehlen neurologischer Defekte bei den Patienten der Familie DCM-I, die Träger der Mutation T34A sind und eine normale Enzymaktivität der Dihydrolipoamid-Dehydrogenase stehen im Einklang mit den bisher in der Literatur beschriebenen Patienten mit Mutationen im DLD, bei denen eine Reduktion der Enzymaktivität der Dihydrolipoamid-Dehydrogenase in erster Linie neurologische Phänotypen verursacht. Darüber hinaus scheint auch ein gewisser Zusammenhang zwischen der Schwere des neurologischen Phänotyps und der restlichen Aktivität der Dihydrolipoamid-Dehydrogenase bzw. der ATP-Produktion zu bestehen. Saada et al. (2000) verglichen die DLD-Aktivität und die ATP-Produktion in drei Patienten mit Dihydrolipoamid-Dehydrogenase Defizienz, die *compound heterozygot* für unterschiedliche Mutationen im DLD waren. Der Patient mit der niedrigsten ATP-Syntheserate (30 % des Normalwertes) hatte schwere neurodegenerative Krankheiten und war seit seiner Geburt in einem vegetativen Zustand. Dagegen war der Patient, dessen ATP-Syntheserate bei 46 % des Normalwertes lag, weitgehend geistig gesund. Anhand der Daten spekulierten Saada et al., dass schon geringe Änderungen der Energieproduktion ausreichend sind, um neuronale Gewebe vor degenerativen Veränderungen zu schützen. Aufgrund dieser Studie sind bei den Patienten mit der Mutation T34A keine neurologischen Defizite zu erwarten, da die Enzymaktivität durch die Mutation nicht verringert wird. Allerdings gibt es bisher in der Literatur noch zu wenige Patienten mit einer DLD-Defizienz, um verlässliche Aussagen über eine Korrelation zwischen Genotyp und Phänotyp zu treffen.

Die Mutation T34A ist also eine dominante Mutation ohne Einfluss auf den mitochondrialen Import des Proteins und ohne Einfluss auf die Enzymaktivität der Dihydrolipoamid-Dehydrogenase. Das bedeutet, dass die Mutation T34A über einen anderen Pathomechanismus wirken muss als die rezessiven Mutationen, die bei anderen Patienten mit Mutationen im DLD identifiziert wurden und alle eine Reduktion der Enzymaktivität zur Folge haben. Ein neuer Pathomechanismus könnte auch das Fehlen neurologischer Defekte und die Entwicklung der dilatativen Kardiomyopathie erklären, wenn die Folgen der Mutation die Funktionsfähigkeit von Neuronen weniger beeinträchtigen als die der Kardiomyozyten. Eine denkbare Möglichkeit, wie die Mutation zu pathologischen Konsequenzen führen könnte, wäre ein unvollständiger oder verzögerter Abbau des abgespaltenen Signalpeptides. Nach der Abspaltung des Signalpeptides durch die Metalloprotease, werden die Signalpeptide weiter prozessiert und degradiert [Stahl et al. 2000]. Der verzögerte Abbau des Signal-

peptides und die daraus folgende Akkumulation des Signalpeptides innerhalb der Mitochondrien könnte dann möglicherweise zur Zerstörung der mitochondrialen Membranen führen [Nicolay et al. 1994] oder zur Reduktion des Membranpotentials, verbunden mit einer Beeinträchtigung der oxidativen Phosphorylierung bzw. der ATP-Produktion [Hugosson et al. 1994]. Die durch die Akkumulation der Signalpeptide verursachten morphologischen Veränderungen der Mitochondrien könnten durch elektronenmikroskopische Aufnahmen in Gewebeschnitten nach einer Autopsie dokumentiert werden. Denkbar wäre aber auch, dass das abgespaltene Signalpeptid eine Rolle bei der Kommunikation zwischen Mitochondrium und Nukleus spielt. Für PARL (*Presenilins-associated Rhomboid-like protein*), ein Protein der äußeren mitochondrialen Membran, konnte gezeigt werden, dass die Abspaltung eines Peptides von der N-terminalen Domäne des Proteins zum einen abhängig ist von der Entwicklung der Zelle und zum anderen, dass das abgespaltene Peptid in den Nukleus transportiert wird [Sík et al. 2004]. Um die Akkumulation des Signalpeptides in den Mitochondrien oder einen Transport des Signalpeptides aus den Mitochondrien in den Nukleus nachzuweisen, gäbe es zwei Möglichkeiten. Zum einen könnte das Signalpeptid N-terminal markiert werden, was dann aber wahrscheinlich den Transport des Proteins nach der Translation aus dem Zytoplasma in die Mitochondrien beeinträchtigen würde. Die andere Möglichkeit wäre die Herstellung eines Antikörpers, der spezifisch gegen die 35 Aminosäuren des Signalpeptides gerichtet ist. Allerdings wäre auch dies durch die hohe Homologie des Signalpeptides, die zwischen den Spezies besteht, nicht ohne Probleme.

Da wir bisher noch keine funktionellen Konsequenzen der Mutation T34A nachweisen konnten, bleibt natürlich die Frage, ob diese Mutation tatsächlich ursächlich für die dilatative Kardiomyopathie in Familie DCM-I ist. Allerdings sprechen die statistischen und genetischen Daten dafür, dass die Mutation T34A die pathogene Mutation in Familie DCM-I ist. Erstens haben wir die proteinkodierenden Exons aller Gene innerhalb der Kandidatenregion sequenziert und außer der Mutation T34A im DLD keine weitere Mutation identifiziert, die mit dem Krankheitsstatus in der Familie segregiert. Zweitens konnten wir die Mutation in 438 Kontrollchromosomen von gesunden Probanden nicht nachweisen. Und darüber hinaus ist die Mutation A100G nicht in der Literatur beschrieben und auch nicht in der Datenbank *dbSNP* (NCBI) annotiert.

Trotz der vorliegenden genetischen Daten für die Mutation T34A im DLD, kann nicht vollständig ausgeschlossen werden, dass es in der Kandidatenregion weitere Mutationen gibt, die mit dem Phänotyp in der Familie segregieren; die wir aber mit den von uns verwendeten Screeningmethoden nicht identifizieren konnten. Wir haben alle proteinkodierenden Exons der Kandidatengene sequenziert und uns erstmal auf diese Methode konzentriert, da ein Großteil der pathogenen Mutationen Einzel-Nukleotid-Polymorphismen sind, die in den proteinkodierenden Sequenzen lokalisiert sind. Mögliche pathogene Mutationen könnten allerdings auch in den 5'-UTRs oder 3'-UTRs ko-

diert sein, die zur Genregulation oder zur Genexpression beitragen. Clop et al. (2006) konnten zeigen, dass eine Mutation in der 3'-UTR des Gens für Myostatin eine Bindungsstelle für zwei miRNAs beeinflusst und so zur phänotypischen Variabilität beitragen kann. Ebenso könnten Mutationen in den Promotorregionen die Wechselwirkungen von Transkriptionsfaktoren mit der DNA verändern und die Expression und Regulation von Genen beeinflussen. Auch größere chromosomale Abnormalitäten wie Inversionen, Duplikationen oder Deletionen konnten wir durch die DNA-Sequenzierung nicht ausschließen. Auch wenn durch diese chromosomalen Umlagerungen die Genstruktur nicht zerstört wird, kämen die Gene trotzdem unter den Einfluss anderer Promotoren oder Enhancer-Sequenzen, wodurch die Genregulation erheblich gestört werden kann. Ein weiterer möglicher Pathomechanismus, der bei der DNA-Sequenzierung unentdeckt bliebe, könnte die abnormale Methylierung von CpG-Sequenzen sein. Die Methylierung der DNA inhibiert die Expression von Genen entwicklungs-spezifisch oder gewebs-spezifisch. So beschrieben D'Cruz et al. (2000) in Patienten mit hypertropher Kardiomyopathie Mutationen im Gen für Troponin T (TNT), die das Methylierungsmuster von CpG-Dinukleotiden verändern und in einer Domäne des Proteins lokalisiert sind, die mit α -Tropomyosin interagiert. Zusätzlich zu den proteinkodierenden Exons oder den Sequenzen, die direkt die Genregulation und Genexpression beeinflussen, sind Sequenzbereiche bekannt, die zwar während der Evolution konserviert wurden, denen aber keine bekannte Funktion zugewiesen werden konnte. Es ist daher wahrscheinlich, dass diese konservierten Sequenzen zur phänotypischen Variabilität beitragen und Mutationen in diesen Sequenzen möglicherweise pathogene Konsequenzen haben können [Dermitzakis et al. 2005]. Die meisten dieser möglichen pathogenen Mutationen betreffen demnach die Regulation und/oder Expression von Genen. Allerdings ist der Nachweis funktioneller Konsequenzen bei diesen Mutationen erheblich schwieriger und aufwendiger als bei Polymorphismen in proteinkodierenden Sequenzen. Die Genregulation und Genexpression ist spezifisch für jeden Zelltyp und zu dem abhängig von der Entwicklungsphase oder den Bedürfnissen des Organismus – gerade in Kardiomyozyten, die extremen Stresssituationen ausgesetzt sein können. Außerdem können regulatorische Sequenzen die Expression von weit entfernt liegenden Genen regulieren, was die Eingrenzung der möglichen funktionellen Konsequenzen von Mutationen in solchen Sequenzbereichen erheblich erschwert. Der Nachweis pathogener Auswirkungen dieser Mutationen wäre dann wahrscheinlich nur über Mausmodelle oder über die Analyse der Genexpression in Kardiomyozyten mit Hilfe von mRNA-Chips möglich.

Bisher wurde eine Reihe von Krankheitsgenen identifiziert, die Ursache einer dilatativen Kardiomyopathie sein können. Doch aufgrund individueller Unterschiede im Verlauf der Krankheit oder in der Ausprägung des klinischen Erscheinungsbildes, sogar bei Familienmitgliedern mit identischer Mutation, bleibt die komplexe Pathogenese der dilatativen Kardiomyopathie größtenteils

noch ungeklärt und wird sicherlich auch durch zusätzliche Faktoren wie Umwelteinflüsse, Lebenswandel oder genetische Prädispositionen beeinflusst. Daher ermöglicht die Identifizierung weiterer für die Funktion des Herzens relevanter Krankheitsgene ein besseres Verständnis der molekularen Mechanismen, die bei der Entstehung von Kardiomyopathien eine Rolle spielen.

5.2 Kandidatengen-Analyse

Mutationen im Gen für Lamin A und Lamin C (LMNA) wurden in Zusammenhang mit mehreren verschiedenen klinischen Phänotypen beschrieben, die kollektiv als Laminopathien bezeichnet werden. LMNA-Mutationen können phänotypische Auswirkungen auf Skelettmuskeln und kardiale Muskeln (Emery-Dreifuss-Muskeldystrophie, Gliedergürtel-Muskeldystrophie, dilatative Kardiomyopathie mit Reizleitungsstörungen) haben. LMNA-Mutationen können auch pathologische Veränderungen im Fettgewebe (Dunnigan`s familiäre Lipodystrophie, Mandibuloakral Dysplasie) oder im periphere Nervensystem (Charcot-Marie-Tooth Syndrom) verursachen. LMNA-Mutationen können einen vorzeitigen Alterungsprozess auslösen (Hutchinson-Gilford Progerie) [Capell and Collins 2006]. Häufig treten bei Trägern von LMNA-Mutationen mehrere dieser Phänotypen gleichzeitig auf. Erstaunlich ist, dass diese so unterschiedlichen Phänotypen durch Mutationen in einem Gen verursacht werden, das in differenzierten Zellen ubiquitär exprimiert wird. Die identifizierten pathogenen Mutationen sind gleichmäßig über das gesamte Gen verteilt und es gibt bislang keine Genotyp-Phänotyp Korrelation.

Lamine sind wichtige Bestandteile der Lamina, einem Netzwerk aus zahlreichen Proteinen, das mit der inneren Kernmembran assoziiert ist. Die Lamina gewährleistet die strukturelle Integrität des Nukleus, ist an der Transkriptionsregulation beteiligt sowie an der Organisation des Chromatins und der Kontrolle des Zellzyklus. Für ein besseres Verständnis der Pathogenese von Laminopathien und für die Entwicklung potentieller therapeutischer Strategien ist es notwendig die molekularen Mechanismen zu identifizieren, wie sich spezifische Mutationen auf die Funktion der Lamina auswirken.

Wir haben in einer deutschen Familie (DCM-II) eine neue pathogene Nonsense-Mutation im Lamin A/C-Gen identifiziert, die mit dilatativer Kardiomyopathie, Reizleitungsstörungen sowie Gliedergürtel-Muskeldystrophie assoziiert ist. Wir konnten in Exon 4 von LMNA einen Basenpaar Austausch von Cytosin nach Thymin an Position 700 (ausgehend von ATG; NM170707) identifizieren. Die Mutation führte zur Insertion eines Stop-Codons an Position 234 der Aminosäuresequenz. Diese Nonsense-Mutation Gln234Stop (Q234X) segregierte in der Familie DCM-II mit dem Phänotyp und konnte in 180 Chromosomen von gesunden Kontrollen nicht detektiert werden.

Vorzeitige Stop-Codons (PTC) können unterschiedliche Konsequenzen haben. Erstens könnte ein trunkiertes Protein gebildet werden, das durch einen dominant-negativen Effekt auch die Funktion des verbleibenden Wildtyp-Proteins beeinträchtigen kann. Zweitens wurde beschrieben, dass PTCs einen alternativen Spleißvorgang (*nonsense-associated altered splicing*, NAS) induzieren können [Vuoristo et al. 2004]. Drittens könnte ein PTC die Stabilität von mRNA-Transkripten vermindern,

da die fehlerhafte mRNA von einem Kontrollmechanismus der Zelle (*nonsense-mediated mRNA decay*, NMD) erkannt und für einen raschen Abbau markiert wird.

Bei dem Großteil der mehr als 100 im LMNA identifizierten pathogenen Mutationen, handelt es sich um Missense-Mutationen. Da Lamin-Monomere miteinander interagieren, um höher geordnete Intermediärfilamente zu bilden und auch Wechselwirkungen zwischen Laminen und anderen Kern- oder Laminaproteinen beschrieben wurden, ergab sich daraus die Hypothese, dass Laminopathien durch einen dominant-negativen Effekt verursacht werden. Bisher sind nur drei weitere Nonsense-Mutationen im LMNA beschrieben worden. Arbustini et al. (2002) identifizierten die Nonsense-Mutation E111X in einem Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie und Reizleitungsstörungen. In Hautfibroblasten dieser Patienten tauchte in der Western-Blot-Analyse eine unerwartete Bande bei 30 kDa auf, aber keine Bande von dem potentiell trunkierten Protein bei 12 kDa. Das deutete darauf hin, dass das mutierte Protein zum einen instabil war und zum anderen zu einem erhöhten Abbau des Wildtyp-Proteins beitrug, wodurch die Hypothese eines dominant-negativen Effektes als Pathomechanismus gestützt wurde.

Muchir et al. (2003) identifizierten in einem Patienten mit LGMD-1B im LMNA die heterozygote Mutation Y259X. In der Western-Blot-Analyse wurde eine Reduktion der Expression von Lamin A und Lamin C beobachtet. Das potentiell trunkierte Laminprotein konnte nicht detektiert werden. Allerdings haben Muchir et al. nicht gezeigt, ob das Protein instabil war, oder ob schon die mutierte mRNA durch NMD oder einen anderen Mechanismus abgebaut wurde. Auch Becane et al. (2000) zeigten in Herzgewebe von Patienten mit Emery-Dreifuss-Muskeldystrophie, die heterozygot für die Mutation Q6X waren, eine Reduktion der Proteinexpression. Beim Pathomechanismus der Mutation Q6X handelt es sich wahrscheinlich nicht um einen dominant-negativen Effekt, da das möglicherweise exprimierte Proteinfsegment mit einer Länge von nur 6 Aminosäure wohl zu klein ist, um die Wechselwirkungen zwischen Laminmolekülen untereinander oder Interaktionen von Laminen mit anderen Proteine zu behindern. Es bleibt aber anzumerken, dass für keine der drei Nonsense-Mutationen gezeigt wurde, dass das PTC zu einem Abbau der mutierten Transkripte durch NMD führt.

Bei der Sequenzanalyse der Lamintranskripte aus Lymphozyten LMNA^{Q234X/+} konnten wir nur das Allel mit der Wildtypsequenz identifizieren, nicht aber das Allel mit der Mutation Q234X. Nach Inkubation der LMNA^{Q234X/+} Lymphozyten mit Cycloheximid oder Emetin, wodurch der NMD und die Degradation der mutierten Lamintranskripte inhibiert wurde, waren die Transkripte mit dem PTC bei der Sequenzanalyse wieder nachweisbar. Bei der PCR-Analyse der LMNA cDNA mit Primern im ersten und letzte Exon der cDNA, konnten wir nur ein erwartetes Fragment identifizieren, aber keine alternativen Spleißprodukte. Die Analyse der Proteinexpression mittels Western-

Blot zeigte, dass die Menge an Lamin A und C in LMNA^{Q234X} Fibroblasten im Vergleich zu Wildtypzellen (LMNA^{+/+}) von gesunden Individuen deutlich reduziert war. Außerdem konnten wir mit dem Western-Blot das möglicherweise vom mutierten Allel gebildete trunkierte Laminprotein mit einem potentiellen Molekulargewicht von etwa 27 kDa nicht detektieren, obwohl ein Antikörper verwendet wurde, der spezifisch die ersten 171 Aminosäuren der N-terminalen Domäne der Laminproteine erkannte. Damit konnten wir für die Mutation Q234X sowohl ausschließen, dass ein trunkiertes Protein gebildet wurde, als auch, dass ein alternativer Spleißvorgang induziert wurde. Dagegen konnten wir zum ersten Mal zeigen, dass die Transkripte mit dem vorzeitigen PTC tatsächlich vom NMD erkannt und abgebaut werden. Das bedeutete, dass Laminopathien nicht nur durch einen dominant-negativen Effekt verursacht werden können. Sondern auch eine Haploinsuffizienz von Lamin A und Lamin C Proteinen, bedingt durch die Degradation der mutierten Transkripte mittels NMD, kann zu einer Entwicklung von dilatativer Kardiomyopathie führen.

In den meisten Fällen erfüllt der NMD eine Schutzfunktion in der Zelle, da die Zelle mit dem Abbau der mutierten Transkripte die Expression trunkierter Proteine vermeidet, die durch einen dominant-negativen Effekt möglicherweise einen schädlicheren Effekt für die Zelle hätten als eine Reduktion der Proteinexpression [Frischmeyer, Dietz 1999]. Es gibt Schätzungen, wonach ein Drittel der familiären genetischen Erkrankungen und viele Krebsarten durch Mutationen verursacht werden, die in einem vorzeitigen Stop-Codon resultieren, welches durch NMD erkannt und degradiert wird. Dementsprechend führen PTCs in der Regel zu keinem klinischen Krankheitsbild oder wenigstens zu einem milderem Phänotyp als Missense-Mutationen, wie z.B. beim Marfan-Syndrom gezeigt werden konnte. Das Marfan-Syndrom ist eine autosomal-dominant vererbte Bindegewebskrankung, die durch Mutationen im Fibrillinen (FBN1) verursacht wird. Dominant-negative Interaktionen zwischen mutierten und Wildtyp-Fibrillinmonomeren resultieren in einer Zerstörung der extrazellulären Mikrofibrillen und machen sich phänotypisch durch Abnormalitäten im Herz- und Gefäßsystem, im Augenapparat sowie im Skelettsystem bemerkbar. Im Gegensatz zu Patienten mit Missense-Mutationen entwickeln Patienten mit einer Nonsense-Mutation, die mit einer Reduktion der mutierten Transkripte assoziiert ist, einen erheblich milderem Phänotyp, z.B. ohne Gefäß- oder Augenerkrankungen [Frischmeyer, Dietz 1999]. Auch bei der β -Thalassämie zeigt sich die medizinische Bedeutung des NMD. Patienten mit der rezessiven Form der β -Thalassämie, die durch NMD-sensitive PTCs verursacht wird, sind klinisch asymptomatisch. Die mutierten Allele werden durch NMD degradiert, so dass keine trunkierten Proteine gebildet werden. Und die vom gesunden Allel exprimierte Proteinmenge ist für die Funktionsfähigkeit der Zelle ausreichend. Allerdings zeigen die Patienten einen klinischen Phänotyp, wenn das PTC im letzten Exon des β -Globin Gens lokalisiert ist, wodurch es dem NMD entgeht und trunkierte Proteine exprimiert werden, die die Funktion der Wildtyp-Proteine beeinträchtigen [Baserga, Benz 1988].

Allerdings ist der Abbau des mutierten Transkriptes nur so lange von Vorteil für die Zelle bis die Menge des verbleibenden Wildtyp-Proteins nicht mehr ausreicht, um die Funktionsfähigkeit aufrecht zu erhalten. Über einen längeren Zeitraum betrachtet scheint die verringerte Konzentration an Laminproteinen nicht mehr ausreichend zu sein, so dass die Lamina ihre komplexen strukturellen und/oder funktionellen Aufgaben nicht mehr erfüllen kann. In elektronenmikroskopischen Aufnahmen von Kernen aus LMNA^{Q234X/+} Fibroblasten konnten wir zwar keine strukturellen Veränderungen der Kernhülle beobachten. Allerdings beschrieben Nikolova et al. (2004), dass in Kardiomyozyten von Mäusen, die heterozygot für LMNA waren (LMNA^{+/-}), Zellkerne mit einer abnormalen Morphologie, einer Fehlverteilung von Chromatin und einer Erweiterung des Intermembranraumes zwischen äußerer und innerer Kernmembran auftreten. Auch Lammerding et al. (2006), die Mausembryo-Fibroblasten mit einer LMNA-Defizienz auf einer Fibronektin beschichteten Silikonmembran ausplattierten und dann mechanischem Stress ausgesetzt haben, beobachteten in einem Großteil der Fibroblasten deformierte Zellkerne. Allerdings kam es nur bei einem geringen Prozentsatz der Zellen (3–5 %) zu einer Ruptur des Nukleus. Einen ähnlich geringen Prozentsatz an zerstörten Kernen fanden Markiewicz et al. (2002) in Muskelgewebe von Patienten mit Emery-Dreifuss-Muskeldystrophie. Aber auch eine sehr kleine Anzahl apoptotischer Kardiomyozyten (23 von 10⁵) ist schon ausreichend, um eine lethale dilatative Kardiomyopathie zu verursachen, wie Wencker et al. (2003) in transgenen Mäusen zeigen konnten, die eine konditionell aktive Kaspase im Myokard exprimierten. Diese Ergebnisse machen deutlich, dass eine verringerte Expression der Laminproteine nicht in jeder Zelle zwangsläufig sichtbare negative Folgen für die Stabilität der Kernmembran haben muss. Erst in Zellen, die hoher mechanischer Belastung ausgesetzt sind, wie Kardiomyozyten und Skelettmuskelzellen, kann diese Reduktion über einen längeren Zeitraum zu einer Schwächung der Integrität des Nukleus beitragen. Da die Lamina mit dem muskelspezifischen Intermediärfilament Desmin interagiert zieht eine Ruptur des Nukleus auch eine Disorganisation des Desminnetzwerkes und der Myofibrillen nach sich. Das Resultat dieser verminderten Spannung des Zytoskellettes wäre wahrscheinlich eine Beeinträchtigung der Kraftübertragung und damit eine kontraktile Dysfunktion. Auch Mäuse mit einer heterozygoten Lamin-Deletion waren anfänglich nicht unterscheidbar von den Wildtyp-Tieren und zeigten bis sechs Wochen nach der Geburt keine Anzeichen einer dilatativen Kardiomyopathie [Nikolova et al. 2004]. Erst einjährige LMNA^{+/-} Mäuse entwickelten Reizleitungsstörungen und Kardiomyopathie [Burke and Stewart 2006].

Laminmutationen können ein weites Spektrum an klinischen Phänotypen verursachen, die nicht alle durch die Schwächung der Kernmembran und des Zytoskellettes zu erklären sind. Insbesondere in der Pathophysiologie von Lipodystrophien wird deutlich, dass die Lamina nicht nur strukturelle Aufgaben hat. Mutationen, die Lipodystrophien verursachen, beeinträchtigen vielmehr die Bindung

zum Chromatin oder an andere Proteine, wodurch spezifische Signalwege oder Zellfunktionen betroffen sein könnten. So konnten Capanni et al. (2003) in einem Lipodystrophie-Patienten zeigen, dass die LMNA-Mutation R482L unter anderem auch die Funktion der RNA-PolymeraseII negativ beeinflusst. Bisher gibt es noch keine abschließende Erklärung, warum Mutationen in einem Gen so viele verschiedene Phänotypen verursachen können. Selbst innerhalb einer Familie mit einer einzigen Mutation tritt eine erhebliche Variabilität des Phänotyps auf [Mercuri et al. 2004]. Auch Mausmodelle, mit denen versucht wurde die Pathophysiologie der LMNA-Mutationen zu ergründen, führten nicht immer zu dem erwarteten Ergebnis. Zum Beispiel wurden bei den in letzter Zeit erzeugten Knock-in Mäusen mit spezifischen humanen LMNA-Mutationen andere Phänotypen beobachtet als bei den Patienten. Die heterozygote Mutation L530P verursacht beim Menschen eine Emery-Dreifuss-Muskeldystrophie. Mäuse, die heterozygot für L530P waren, zeigten dagegen bis 6 Monate nach der Geburt keine Anzeichen einer Muskelschwäche. Homozygote Knock-in Mäuse (LMNA^{L530P/L530P}) entwickelten klinische Symptome von Progerie und verstarben bereits nach 4 Wochen [Mounkes et al. 2003].

Mit der Identifikation weiterer Mutationen im LMNA, oder wie der kürzlich ersten Mutation im Gen für Lamin B1 [Padiath et al. 2006], werden wahrscheinlich zusätzliche überlappende Phänotypen beschrieben, die einen Beitrag zum Verständnis der Dynamik der Kernlamina und der Pathophysiologie von Laminopathien leisten können [Capell and Collins 2006].

6 Literaturverzeichnis

ABECASIS GR, CHERNY SS, COOKSON WO, CARDON LR

Merlin-rapid analysis of dense genetic maps using sparse gene flow trees. *Nat Genet* 30:97-101, 2002

AHMAD F, SEIDMAN JG, SEIDMAN CE

The genetic basis for cardiac remodeling. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 6:185-216, 2005

AMRANI N, SACHS MS, JACOBSON A

Early nonsense: mRNA decay solves a translational problem. *Nat Rev Mol Cell Biol.*7(6):415-25, 2006

ARBER S, HUNTER JJ, ROSS J JR, HONGO M, SANSIG G, BORG J, PERRIARD JC, CHIEN KR, CARONI P

MLP-deficient mice exhibit a disruption of cardiac cytoarchitectural organization, dilated cardiomyopathy, and heart failure. *Cell.* 7;88(3):393-403, 1997

ARBUSTINI E, PILOTTO A, REPETTO A, GRASSO M, NEGRI A, DIEGOLI M, CAMPANA C, SCELSI L, BALDINI E, GAVAZZI A, TAVAZZI L

Autosomal dominant dilated cardiomyopathy with atrioventricular block: a lamin A/C defect-related disease. *J Am Coll Cardiol* 39(6):981-90, 2002

ATTARDI G, CHING E

Biogenesis of mitochondrial proteins in HeLa cells. *Methods Enzymol.* 56:66-79, 1979

BASERGA SJ, BENZ EJ JR

Nonsense mutations in the human beta-globin gene affect mRNA metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 85(7):2056-60, 1988

BECANE HM, BONNE G, VARNOUS S, MUCHIR A, ORTEGA V, HAMMOUDA EH, URTIZBEREA JA, LAVERGNE T, FARDEAU M, EYMARD B, WEBER S, SCHWARTZ K, DUBOC D

High incidence of sudden death with conduction system and myocardial disease due to lamins A and C gene mutation. *Pacing Clin Electrophysiol* 23(11 Pt 1):1661-6, 2000

BIONE S, MAESTRINI E, RIVELLA S, MANCINI M, REGIS S, ROMEO G, TONIOLO D

Identification of a novel X-linked gene responsible for Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Nat Genet.* 8(4):323-7, 1994

BONNE G, DI BARLETTA MR, VARNOUS S, BECANE HM, HAMMOUDA EH, MERLINI L, MUNTONI F, GREENBERG CR, GARY F, URTIZBEREA JA, DUBOC D, FARDEAU M, TONIOLO D, SCHWARTZ K

Mutations in the gene encoding lamin A/C cause autosomal dominant Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Nat Genet.* 21(3):285-8, 1999

BREGA A, NARULA J, ARBUSTINI E

Functional, structural, and genetic mitochondrial abnormalities in myocardial diseases. *J Nucl Cardiol.* 8(1):89-97, 2001

BROERS J, MACHIELS B, KUIJPERS H, SMEDTS F, KIEBOOM R, RAYMOND Y, RAMAECKERS F

A- and B-type lamins are differentially expressed in normal human tissues. *Histochem Cell Biol.* 107(6):505-17, 1997

BROERS JL, PEETERS EA, KUIJPERS HJ, ENDERT J, BOUTEN CV, OOMENS CW, BAAIJENS FP, RAMAEKERS FC

Decreased mechanical stiffness in LMNA^{-/-} cells is caused by defective nucleo-cytoskeletal integrity: implications for the development of laminopathies. *Hum Mol Genet.* 13(21):2567-80, 2004

BROMAN KW, MURRAY JC, SHEFFIELD VC, WHITE RL, WEBER JL

Comprehensive human genetic maps: individual and sex-specific variation in recombination. *Am J Hum Genet.* 63(3):861-9, 1998

BROERS JL, PEETERS E, KUIJPERS HJ, ENDERT J, BOUTEN C, OOMENS C, BAAIJENS F, RAMAECKERS FC

Decreases mechanical stiffness in LMNA^{-/-} cells is caused by defective nucleo-cytoskeletal integrity: implications for the development of laminopathies. *Hum Mol Genet* 13: 2567-80, 2004

BURKE B, STEWART CL

The Laminopathies: The Structure of the Nucleus and Its Involvement in Disease. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 7: 369-405, 2006

CAPANNI C, CENNI V, MATTIOLI E, SABATELLI P, OGNIBENE A, COLUMBARO M, PARNAIK VK, WEHNERT M, MARALDI NM, SQUARZONI S, LATTANZI G

Failure of lamin A/C to functionally assemble in R482L mutated familial partial lipodystrophy fibroblasts: altered intermolecular interaction with emerin and implications for gene transcription. *Exp Cell Res.* 291(1):122-34, 2003

CAPELL BC, COLLINS FS

Human laminopathies: nuclei gone genetically awry. *Nat Rev Genet.* 7(12):940-52, 2006

CARVAJAL K, MORENO-SANCHEZ R

Heart Metabolic Disturbances in Cardiovascular Diseases. *Arch Med Res* 34, 89-99, 2003

CHAKRABORTY R, KIMMEL M, STIVERS ND, DAVISON LJ, DEKA R

Relative mutation rates at di, tri and tetranucleotide microsatellite loci. *Proc Natl Acad Sci* 94: 1041-1051, 1997

CHANG AN, POTTER JD

Sarcomeric protein mutations in dilated cardiomyopathy. *Heart Fail Rev.* 10(3):225-35, 2005

CHU A, RASSADI R, STOCHAJ U

Velcro in the nuclear envelope: LBR and LAPs. *FEBS Lett.* 18;441(2):165-9, 1998

CLARK KA, McELHINNY AS, BECKERLE MC, GREGORIO CC

Striated muscle cytoarchitecture: an intricate web of form and function. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 18:637-706, 2002

CLEMENTS L, MANILAL S, LOVE DR, MORRIS GE

Direct interaction between emerin and lamin A. *Biochem Biophys Res Commun.* 267:709-14, 2000

CLOP A, MARCQ F, TAKEDA H, PIROTTIN D, TORDOIR X, BIBE B, BOUIX J, CAIMENT F, ELSSEN JM, EYCHENNE F, LARZUL C, LAVILLE E, MEISH F, MILENKOVIC D, TOBIN J, CHARLIER C, GEORGES M

A mutation creating a potential illegitimate microRNA target site in the myostatin gene affects muscularity in sheep. *Nat Genet.* 38(7):813-8, 2006

- CODD MB, SUGRUE DD, GERSH BJ, MELTON LJ 3RD
Epidemiology of idiopathic dilated and hypertrophic cardiomyopathy. A population-based study in Olmsted County, Minnesota, 1975-1984. *Circulation*. 80(3):564-72, 1989
- CORBETT JM, WHY HJ, WHEELER CH, RICHARDSON PJ, ARCHARD LC, YACOUB MH, DUNN MJ
Cardiac protein abnormalities in dilated cardiomyopathy detected by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *Electrophoresis*19(11):2031-42, 1998
- COTTINGHAM RW, IDURY RM, SCHAFFER AA
Faster sequential genetic linkage computations. *Am J Hum Genet* 53: 252-263, 1993
- COWIE MR, MOSTERD A, WOOD DA, DECKERS JW, POOLE-WILSON P, SUTTON G, GROBBEE DE
The epidemiology of heart failure. *Eur Heart J*. 18(2):208-25, 1997
- CRACKOWER MA, OUDIT GY, KOZIERADZKI I, SARAO R, SUN H, SASAKI T, HIRSCH E, SUZUKI A, SHIOI T, IRIE-SASAKI J, SAH R, CHENG HY, RYBIN VO, LEMBO G, FRATTA L, OLIVEIRA-DOS-SANTOS AJ, BENOVIC JL, KAHN CR, IZUMO S, STEINBERG SF, WYMAN MP, BACKX PH, PENNINGER JM
Regulation of myocardial contractility and cell size by distinct PI3K-PTEN signaling pathways. *Cell*. 2002 110(6):737-49, 2002
- D'CRUZ LG, BABOONIAN C, PHILLIMORE HE, TAYLOR R, ELLIOTT PM, VARNAVA A, DAVISON F, MCKENNA WJ, CARTER ND
Cytosine methylation confers instability on the cardiac troponin T gene in hypertrophic cardiomyopathy. *J Med Genet*. 37(9):E18, 2000
- DERMITZAKIS ET, REYMOND A, ANTONARAKIS SE
Conserved non-genic sequences - an unexpected feature of mammalian genomes. *Nat Rev Genet*. 6(2):151-7, 2005
- FAVREAU C, DUBOSCLARD E, OSTLUND C, VIGOUROUX C, CAPEAU J, WEHNERT M, HIGUET D, WORMAN HJ, COURVALIN JC, BUENDIA B
Expression of lamin A mutated in carboxyl-terminal tail generates an aberrant nuclear phenotype similar to that observed in cells from patients with dunnigan-type partial lipodystrophy and emery-dreifuss muscular dystrophy. *Exp Cell Res* 282: 14-23, 2003
- FOUNTOULAKIS M, SOUMAKA E, RAPT K, MAVROIDIS M, TSANGARIS G, MARIS A, WEISLEDER N, CAPETANAKI Y
Alterations in the heart mitochondrial proteome in a desmin null heart failure model. *J Mol Cell Cardiol*. 38(3):461-74, 2005
- FRANZ WM, MULLER M, MULLER OJ, HERRMANN R, ROTHMANN T, CREMER M, COHN RD, VOIT T, KATUS HA
Association of nonsense mutation of dystrophin gene with disruption of sarcoglycan complex in X-linked dilated cardiomyopathy. *Lancet* 355: 1781-1785, 2000
- FRISCHMEYER PA, DIETZ HC
Nonsense-mediated mRNA decay in health and disease. *Hum Mol Genet*. 8(10):1893-900, 1999
- GENSCHEL J, SCHMIDT HH
Mutations in the LMNA gene encoding lamin A/C. *Hum Mutat*. 16(6):451-9, 2000

GRAFAKOU O, OEXLE K, VAN DEN HEUVEL L, SMEETS R, TRIJBELS F, GOEBEL HH, BOSSHARD N, SUPERTI-FURGA A, STEINMANN B, SMEITINK J

Leigh syndrome due to compound heterozygosity of dihydrolipoamide dehydrogenase gene mutations. Description of the first E3 splice site mutation. *Eur J Pediatr.* 162(10):714-8, 2003

GRÜNIG E, TASMAN JA, KÜCHERER H, FRANZ W, KÜBLER W, KATUS HA

Frequency and phenotypes of familial dilated cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 31: 186-194, 1998

HOLT IJ, HARDING AE, PETTY RK, MORGAN-HUGHES JA

A new mitochondrial disease associated with mitochondrial DNA heteroplasmy. *Am J Hum Genet.* 46(3):428-33, 1990

HONG YS, KERR DS, LIU TC, LUSK M, POWELL BR, PATEL MS

Deficiency of dihydrolipoamide dehydrogenase due to two mutant alleles (E340K and G101del). Analysis of a family and prenatal testing. *Biochim Biophys Acta.* 1362(2-3):160-8, 1997

HUGOSSON M, ANDREU D, BOMAN HG, GLASER E

Antibacterial peptides and mitochondrial presequences affect mitochondrial coupling, respiration and protein import. *Eur J Biochem.* 223(3):1027-33, 1994

HUNT SA, BAKER DW, CHIN MH, CINQUEGRANI MP, FELDMAN AM, FRANCIS GS, GANIATS TG, GOLDSTEIN S, GREGORATOS G, JESSUP ML, NOBLE RJ, PACKER M, SILVER MA, STEVENSON LW, GIBBONS RJ, ANTMAN EM, ALPERT JS, FAXON DP, FUSTER V, GREGORATOS G, JACOBS AK, HIRATZKA LF, RUSSELL RO, SMITH SC; AMERICAN COLLEGE OF CARDIOLOGY; AMERICAN HEART ASSOCIATION

ACC/AHA guidelines for the evaluation and management of chronic heart failure in the adult: executive summary. *J Heart Lung Transplant.* 21(2):189-203, 2002

HUSS JM, KELLY DP

Mitochondrial energy metabolism in heart failure: a question of balance. *J Clin Invest.* 115(3):547-55, 2005

ISHIGAKI Y, LI X, SERIN G, MAQUAT LE

Evidence for a pioneer round of mRNA translation: mRNAs subject to nonsense-mediated decay in mammalian cells are bound by CBP80 and CBP20. *Cell*106(5):607-17, 2001

ITOH-SATOH M, HAYASHI T, NISHI H, KOGA Y, ARIMURA T, KOYANAGI T, TAKAHASHI M, HOHDA S, UEDA K, NOUCHI T, HIROE M, MARUMO F, IMAIZUMI T, YASUNAMI M, KIMURA A

Titin mutations as the molecular basis for dilated cardiomyopathy. *Biochem Biophys Res Commun.* 291(2):385-93, 2002

JOHNSON MT, YANG HS, MAGNUSON T, PATEL MS

Targeted disruption of the murine dihydrolipoamide dehydrogenase gene (Dld) results in perigastrulation lethality. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94(26):14512-7, 1997

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 the sarcomere protein genes as a cause of dilated cardiomyopathy. *N Engl J Med* 343: 1688-1696, 2000

- KIRBY DM, CRAWFORD M, CLEARY MA, DAHL HH, DENNETT X, THORBURN DR
Respiratory chain complex I deficiency: an underdiagnosed energy generation disorder. *Neurology* 52(6):1255-64, 1999
- KNÖLL R, HOSHIJIMA M, HOFFMAN HM, PERSON V, LORENZEN-SCHMIDT I, BANG ML, HAYASHI T, SHIGA N, YASUKAWA H, SCHAPER W, MCKENNA W, YOKOYAMA M, SCHORK NJ, OMENS JH, MCCULLOCH AD, KIMURA A, GREGORIO CC, POLLER W, SCHAPER J, SCHULTHEISS P, CHIEN KR
The cardiac mechanical stretch sensor machinery involves a Z disc complex that is defective in a subset of human dilated cardiomyopathy. *Cell*. 111(7):943-55, 2002
- KOENIG M, HOFFMAN EP, BERTELSON CJ, MONACO AP, FEENER C, KUNKEL LM
Complete cloning of the Duchenne muscular dystrophy (DMD) cDNA and preliminary genomic organization of the DMD gene in normal and affected individuals. *Cell* 50: 509-517, 1987
- KONG A, GUDBJARTSSON DF, SAINZ J, JONSDOTTIR GM, GUDJONSSON SA, RICHARDSSON B, SIGURDARDOTTIR S, BARNARD J, HALLBECK B, MASSON, G, SHLIEN A, PALSSON ST, FRIGGE ML, THORGEIRSSON TE, GULCHER JR, STEFANSSON K
A high-resolution recombination map of the human genome. *Nat Genet* 31: 241-247, 2002
- LAMMERDING J, FONG LG, JI JY, REUE K, STEWART CL, YOUNG SG, LEE RT
Lamins A and C but not lamin B1 regulate nuclear mechanics. *J Biol Chem*. 281(35):25768-80, 2006
- LE HIR H, GATFIELD D, IZAURRALDE E, MOORE MJ
The exon-exon junction complex provides a binding platform for factors involved in mRNA export and nonsense-mediated mRNA decay. *EMBO J*. 20(17):4987-97, 2001
- LE HIR H, IZAURRALDE E, MAQUAT LE, MOORE MJ
The spliceosome deposits multiple proteins 20-24 nucleotides upstream of mRNA exon-exon junctions. *EMBO J*. 19(24):6860-9, 2000
- LEJEUNE F, ISHIGAKI Y, LI X, MAQUAT LE
The exon junction complex is detected on CBP80-bound but not eIF4E-bound mRNA in mammalian cells: dynamics of mRNP remodeling. *EMBO J*. 21(13):3536-45, 2002
- LEJEUNE F, LI X, MAQUAT LE
Nonsense-mediated mRNA decay in mammalian cells involves decapping, deadenylating, and exonucleolytic activities. *Mol Cell*. 12(3):675-87, 2003
- LENZ BB, WISMAR J, FUCHS S, REIFEGERSTE R, BUCHNER E, BETZ H, SCHMITT B
Insertional mutation of the Drosophila nuclear lamin Dm0 gene results in defective nuclear envelopes, clustering of nuclear pore complexes, and accumulation of annulate lamellae. *J Cell Biol* 137: 1001-1016, 1997
- LEONARD JV, SCHAPIRA AH
Mitochondrial respiratory chain disorders II: neurodegenerative disorders and nuclear gene defects. *Lancet* 355(9201):389-94, 2000
- LI D, TAPSCOTT T, GONZALES O, BURCH PE, QUINONES MA, ZOGHBI WA, HILL R, BACHINSKI LL, MANN DL, ROBERT R
Desmin mutation responsible for idiopathic dilated cardiomyopathy. *Circulation* 100:461-464, 1999

- LI H, WANG J, WILHELMSSON H, HANSSON A, THOREN P, DUFFY J, RUSTIN P, LARSSON NG
Genetic modification of survival in tissue-specific knockout mice with mitochondrial cardiomyopathy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97(7):3467-72, 2000
- LIN F, WORMAN HJ
Structural organization of the human gene encoding nuclear lamin A and nuclear lamin C. *J Biol Chem.* 268: 16321-16326, 1993
- LINDNER TH, HOFFMANN K
easyLINKAGE: a PERL script for easy and automated two-/multi-point linkage analyses. *Bioinformatics* 21: 405-407, 2005
- LLOYD DJ, TREMBATH RC, SHACKLETON S
A novel interaction between lamin A and SREBP1: implications for partial lipodystrophy and other laminopathies. *Hum Mol Genet.* (7):769-77, 2002
- LUDERUS ME, DEN BLAAUWEN JL, DE SMIT OJ, COMPTON DA, VAN DRIEL R
Binding of matrix attachment regions to lamin polymers involves single-stranded regions and the minor groove. *Mol Cell Biol.* 14(9):6297-305, 1994
- MANILAL S, NGUYEN TM, SEWRY CA, MORRIS GE
The Emery-Dreifuss muscular dystrophy protein, emerin, is a nuclear membrane protein. *Hum Mol Genet.* 5(6):801-8, 1996
- MAQUAT LE
Nonsense-mediated mRNA decay: splicing, translation and mRNP dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 5(2):89-99, 2004
- MARKIEWICZ E, VENABLES R, MAURICIO-ALVAREZ-REYES, QUINLAN R, DOROBEK M, HAUSMANOWA-PETRUCEWICZ I, HUTCHISON C
Increased solubility of lamins and redistribution of lamin C in X-linked Emery-Dreifuss muscular dystrophy fibroblasts. *J Struct Biol.* 140(1-3):241-53, 2002
- MERCURI E, POPPE M, QUINLIVAN R, MESSINA S, KINALI M, DEMAY L, BOURKE J, RICHARD P, SEWRY C, PIKE M, BONNE G, MUNTONI F, BUSHBY K
Extreme variability of phenotype in patients with an identical missense mutation in the lamin A/C gene: from congenital onset with severe phenotype to milder classic Emery-Dreifuss variant. *Arch Neurol.* 61(5):690-4, 2004
- MESTRONI L, MAISCH B, MCKENNA WJ, SCHWARTZ K, CHARRON P, ROCCO C, TESSON F, RICHTER A, WILKE A, KOMAJDA M
Guidelines for the study of familial dilated cardiomyopathies. Collaborative Research Group of the European Human and Capital Mobility Project on Familial Dilated Cardiomyopathy. *Eur Heart J.* 20(2):93-102, 1999
- MOIR RD, SPANN TP, HERRMANN H, GOLDMAN RD.
Disruption of nuclear lamin organization blocks the elongation phase of DNA replication. *J Cell Biol.* 149(6):1179-92, 2000
- MOOTHA VK, ARAI AE, BALABAN RS
Maximum oxidative phosphorylation capacity of the mammalian heart. *Am J Physiol.* 272(2 Pt 2):H769-75, 1997

MOUNKES LC, KOZLOV S, HERNANDEZ L, SULLIVAN T, STEWART CL

A progeroid syndrome in mice is caused by defects in A-type lamins. *Nature* 423(6937): 298-301, 2003

MUCHIR A, MEDIONI J, LALUC M, MASSART C, ARIMURA T, VAN DER KOOI AJ, DESGUERRE I, MAYER M, FERRER X, BRIAULT S, HIRANO M, WORMAN HJ, MALLET A, WEHNERT M, SCHWARTZ K, BONNE G

Nuclear envelope alterations in fibroblasts from patients with muscular dystrophy, cardiomyopathy, and partial lipodystrophy carrying lamin A/C gene mutations. *Muscle Nerve*. 30(4):444-50, 2004

MUCHIR A, VAN ENGELEN BG, LAMMENS M, MISLOW JM, McNALLY E, SCHWARTZ K, BONNE G

Nuclear envelope alterations in fibroblasts from LGMD1B patients carrying nonsense Y259X heterozygous or homozygous mutation in lamin A/C gene. *Exp Cell Res*. 291(2):352-62, 2003

NAGY E, MAQUAT LE

A rule for termination-codon position within intron-containing genes: when nonsense affects RNA abundance. *Trends Biochem Sci*. 23(6):198-9, 1998

NICOLAY K, LATERVEER FD, VAN HEERDE WL

Effects of amphipathic peptides, including presequences, on the functional integrity of rat liver mitochondrial membranes. *J Bioenerg Biomembr*. 26(3):327-34, 1994

NIKOLOVA V, LEIMENA C, McMAHON AC, TAN JC, CHANDAR S, JOGIA D, KESTEVEN SH, MICHALICEK J, OTWAY R, VERHEYEN F, RAINER S, STEWART CL, MARTIN D, FENELEY MP, FATKIN D

Defects in nuclear structure and function promote dilated cardiomyopathy in lamin A/C-deficient mice. *J. Clin. Invest*. 113: 357-369, 2004

OLSON TM, MICHELS VV, THIBODEAU SN, TAI YS, KEATING MT

Actin mutations in dilated cardiomyopathy, a heritable form of heart failure. *Science* 280: 750-752, 1998

OLSON TM, KISHIMOTO NY, WHITBY FG, MICHELS VV

Mutations that alter the surface charge of alpha-tropomyosin are associated with dilated cardiomyopathy. *J Mol Cell Cardiol* 33: 723-732, 2001

OLSON TM, ILLENBERGER S, KISHIMOTO NY, HUTTELMAIER S, KEATING MT, JOCKUSCH BM

Metavinculin mutations alter actin interaction in dilated cardiomyopathy. *Circulation* 105: 431-437, 2002

ORITZ-LOPEZ R, LI H, SU J, GOYTIA V, TOWBIN JA

Evidence for a dystrophin missense mutation as a cause of X-linked dilated cardiomyopathy. *Circulation* 95: 2434-2440, 1997

OTT J

Analysis of Human Genetic Linkage (Third Edition). *The Johns Hopkins University Press*, 1999

OZAKI T, SAIJO M, MURAKAMI K, ENOMOTO H, TAYA Y, SAKIYAMA S

Complex formation between lamin a and the retinoblastoma gene product: identification of the domain on lamin required for its interaction. *Oncogene* 9: 2649-2653, 1994

PADIATH QS, SAIGOH K, SCHIFFMANN R, ASAHARA H, YAMADA T, KOEPPEN A, HOGAN K, PTA-
CEK LJ, FU YH

Lamin B1 duplications cause autosomal dominant leukodystrophy. *Nat Genet* 38(10):1114-23, 2006

PATRUCCO E, NOTTE A, BARBERIS L, SELVETELLA G, MAFFEI A, BRANCACCIO M, MARENGO S,
RUSSO G, AZZOLINO O, RYBALKIN SD, SILENGO L, ALTRUDA F, WETZKER R, WYMANN MP,
LEMBO G, HIRSCH E

PI3Kgamma modulates the cardiac response to chronic pressure overload by distinct kinase-
dependent and -independent effects. *Cell*. 118(3):375-87, 2004

PETES TD, GREENWELL PW, DOMINSKA M

Stabilization of microsatellite sequences by variant repeats in the yeast. *Genetics* 146: 491-498, 1997

REMME WJ, SWEDBERG K

Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic heart failure. *Eur Heart J*. 22(17):1527-60, 2001

RICE JE AND LINDSAY JG

Subcellular fractionation of mitochondria. In *Subcellular Fractionation: A Practical Approach* (J.M. Graham and D. Rickwood, eds.) pp. 107-142. IRL Press, Oxford, 1997

SAADA A, APTOWITZER I, LINK G, ELPELEG ON

ATP synthesis in lipoamide dehydrogenase deficiency. *Biochem Biophys Res Commun*. 269(2):382-6, 2000

SCHMITT JP, KAMISAGO M, ASAHI M, LI GH, AHMAD F, MENDE U, KRANIAS EG, MACLENNAN
DH, SEIDMAN JG, SEIDMAN CE

Dilated cardiomyopathy and heart failure caused by a mutation in phospholamban. *Science*. Feb 28;299(5611):1410-3, 2003

SCHONBERGER J, WANG L, SHIN JT, KIM SD, DEPREUX FF, ZHU H, ZON L, PIZARD A, KIM JB,
MACRAE CA, MUNGALL AJ, SEIDMAN JG, SEIDMAN CE

Mutation in the transcriptional coactivator EYA4 causes dilated cardiomyopathy and sen-
sorineural hearing loss. *Nat Genet*. 37(4):418-22, 2005

SIK A, PASSER BJ, KOONIN EV, PELLEGRINI L

Self-regulated cleavage of the mitochondrial intramembrane-cleaving protease PARL yields
Pbeta, a nuclear-targeted peptide. *J Biol Chem*. 279(15):15323-9, 2004

SMITH PK, KROHN RI, HERMANSON GT, MALLIA AK, GARTNER FH, PROVENZANO MD, FUJIMOTO
EK, GOEKE NM, OLSON BJ, KLENK DC

Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem*. 150(1):76-85, 1985

SPANN TP, GOLDMAN AE, WANG C, HUANG S, GOLDMAN RD

Alteration of nuclear lamin organization inhibits RNA polymerase II-dependent transcription. *J Cell Biol*. 156(4):603-8, 2002

STAHL A, PAVLOV PF, SZIGYARTO C, GLASER E

Rapid degradation of the presequence of the f1beta precursor of the ATP synthase inside mito-
chondria. *Biochem J*. 349 Pt 3:703-7, 2000

- SULLIVAN T, ESCALANTE-ALCALDE D, BHATT H, ANVER M, BHAT N, NAGASHIMA K, STEWART CL, BURKE B
Loss of A-type lamin expression compromises nuclear envelope integrity leading to muscular dystrophy. *J Cell Biol.* 147(5):913-20, 1999
- SYLVIUS N, BILINSKA ZT, VEINOT JP, FIDZIANSKA A, BOLONGO PM, POON S, MCKEOWN P, DAVIES RA, CHAN K, TANG AS, DYACK S, GRZYBOOWSKI J, RUZYLLO W, MCBRIDE H, TESSON F
In vivo and in vitro examination of the functional significances of novel lamin gene mutations in heart failure patients. *J Med Genet* 42: 639-647, 2005
- TAUTZ D
Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Res* 17: 6463-6471, 1989
- TERWILLIGER JD, OTT J
Handbook of Human Genetic Linkage. *The Johns Hopkins University Press, 1994*
- TOWBIN JA, HEJTMANCIK JF, BRINK P, GELB B, ZHU X, CHAMBERLAIN JS, MCCABE ER, SWIFT M
X-linked dilated cardiomyopathy: molecular genetic evidence of linkage to the Duchenne muscular dystrophy (dystrophin) gene at the Xp21 locus. *Circulation* 87: 1854-1865, 1993
- VASAN RS, LARSON MG, LEVY D, EVANS JC, BENJAMIN EJ
Distribution and categorization of echocardiographic measurements in relation to reference limits: the Framingham Heart Study: formulation of a height- and sex-specific classification and its prospective validation. *Circulation.* 16;96(6):1863-73, 1997
- VENTURA-CLAPIER R, GARNIER A, VEKSLER V
Energy metabolism in heart failure. *J Physiol.* 555(Pt 1):1-13, 2004
- VUORISTO MM, PAPPAS JG, JANSEN V, ALA-KOKKO L
A stop codon mutation in COL11A2 induces exon skipping and leads to non-ocular Stickler syndrome. *Am J Med Genet A.* 130(2):160-4, 2004
- WEBER JL, WONG C
Mutation of human short tandem repeats. *Hum Mol Genet* 2: 1123-1128, 1993
- WENCKER D, CHANDRA M, NGUYEN K, MIAO W, GARANTZIOTIS S, FACTOR SM, SHIRANI J, ARMSTRONG RC, KITSIS RN
A mechanistic role for cardiac myocyte apoptosis in heart failure. *J Clin Invest.* 111(10):1497-504, 2003
- WIERDL M, DOMINSKA M, PETES TD
Microsatellite instability in yeast: dependence on the length of the microsatellite. *Genetics* 146: 769-779, 1997
- WYDNER KL, MCNEIL JA, LI F, WORMAN HJ, LAWRENCE JB
Chromosomal assignment of human nuclear envelope protein genes LMNA, LMNB1, and LBR by fluorescence in situ hybridization. *Genomics* 32: 474-478, 1996

7 Anhang

7.1 Material

7.1.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterial

Agar	Becton,Dickinson and Company
Agarose low EEO	Sigma
Ammoniumpersulfat (APS)	AppliChem
Ampicillin	Sigma
ATP	Fermentas
Big Dye Terminator Mix 3.1	Applied Biosystems
Borsäure	Merck
Bromphenol-Blau	Serva
Calciumchlorid	AppliChem
CCCP	Sigma
Chloroform	AppliChem
Cycloheximid	Sigma
Cyclosporin A	Sigma
Dextranblau	Fluka
Dihydrolipoamid	Sigma
Dimethylsulfoxid	Sigma
DNA-Marker	MBI-Fermentas
dNTP-Mix (10 mM)	MBI Fermentas
EDTA	Merck
EGTA	Sigma
Emetin	Sigma
Essigsäure	J.T.Baker
Ethanol	Sigma
Ethidiumbromid	Sigma
Ethylacetat	Sigma
Falcon-Röhrchen (50 ml, 15 ml)	Greiner
FCS	Sigma
Ficoll Paque™ Plus	Amersham Bioscience
Formamid	Applied Biosystems
GeneScan-500 (TAMRA Größenstandard)	Applied Biosystems
Glucose	Sigma
Glycerol	Sigma
Glycin	Merck
H ₂ O HPLC	AppliChem
Hank's gepufferte Salzmischung (HBSS)	AppliChem
Hefeextrakt	Becton,Dickinson and Company
HEPES	Sigma
INT	Sigma
Isopropanol	AppliChem
Kaliumacetat	Merck
KCl	Merck

KH ₂ HPO ₄	Merck
K ₂ HPO ₄	Merck
KOH	Merck
Klebedeckel für PCR-Platten	PeqLab
Ladepuffer	MBI-Fermentas
Lipofectamine 2000	Invitrogen
Mannitol	Fluka
Mercaptoethanol	Sigma
Methanol	J.T.Baker
Methionin ³⁵ S	Amersham
MgCl ₂ (25 mM)	Applied Biosystems
MOPS	Sigma
Na ₂ HPO ₄	Merck
NaCl	Merck
NAD ⁺	Sigma
NaOH	Merck
Natriumacetat	Sigma
Natriumthiocyanat	Merck
Papierkamm ABI Sequenzer 377	MWG Biotech AG
PCR-Platten 384er	AppliedBiosystems
PCR-Platten 96er	Nerbe Plus
Performance Optimizer Polymer (POP7)	Applied Biosystems
Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1)	AppliChem
Pipettenspitzen	StarLab
PonceauS	Sigma
Reaktionsgefäße (1,5ml; 2ml)	Sarstedt
RNase Inhibitor <i>RNaseOUT</i>	Stratagene
RPMI 1640 Medium	Gibco
Röntgenfilm SuperXR	FujiFilm
SDS	Serva
Succinat	Sigma
Sucrose	AppliChem
TAE-Puffer 50x	AppliChem
TEMED	Sigma
Template Suppression reagent	Applied Biosystems
Tris(hydromethyl)aminomethan	Merck
Triton X-100	Sigma
Trypsin	Sigma
Tryptone	Becton,Dickinson and Company
Tween 20	Sigma
Ultra Pure SequaGel Complete Buffer reagent	National diagnostics
Ultra Pure SequaGel XR	National Diagnostics
Xylen Cyanol FF	Sigma
Zellkulturgefäße T25, T75, 6-Well-Platte	Greiner

7.1.2 Enzyme

DNA-Polymerase (<i>HotFire</i> Polymerase)	Solis Biodyne
Exonuklease	New England Biolabs
Proteinase K	Sigma
Restriktionsenzyme	New England Biolabs
RNase A	Qiagen
Shrimp Alkaline Phosphatase	Amersham Biosciences
SuperScript III Reverse Transkriptase	Invitrogen
T4-DNA-Ligase	Invitrogen
T7-RNA-Polymerase	Promega

7.1.3 Antikörper

Anti- β -Actin I-19	Santa Cruz Biotechnology
Anti-GFP JL-8	Clontech
Anti-Lamin A/C JoL5	Abcam
Anti-Lipoamid-Dehydrogenase (#100-4160)	Rockland
Anti-Prohibitin (ab2996)	Abcam
Goat Anti-Mouse IgG (H+L)-HRP Conjugate	Biorad
Goat Anti-Rabbit IgG (H+L)-HRP Conjugate	Biorad

7.1.4 Geräte

ABI-Prism DNA Sequenzer 377	Perkin Elmer
ABI-Prism Genetic Analyzer 3730	Perkin Elmer
Bakterienschüttler Certomat	Braun
Brutschrank B12 (Bakterien)	Heraeus
Digitalkamera DS-M5	Nikon
Fastblot Elektrobloetter	Biometra
Feinwaage Analytic AC 120S	Satorius
Fluoreszenzmikroskop Axiovert 200	Zeiss
Geldokumentationsgerät GelJet Imager	Intas
Gelkammer MINISUB (DNA-Gele)	BioRad
Gelkammer (Proteingele)	Phase
Geltrockner 583	BioRad
Inkubator (Zellen)	Labotect
LightCycler 2.0	Roche
Mikroplatten-Lesegerät	MWG Biotech
Mikroskop Axiovert 25	Zeiss
Multikanalpipette (10 μ l, 100 μ l, 1000 μ l)	Eppendorf
PCR-Maschine GeneAmp PCR-System 9700	Applied Biosystems
PCR-Maschine (96er)	Biorad
pH-Meter PHM 92	Meterlab

Pipette SL 2 µl	Rainin
Pipetten (20 µl, 200 µl, 1000 µl)	Gilson
Pipettierhilfe accu-jet	Brand
Powersupply	Biometra
Röntgenfilmentwickler X-OMAT 35	Kodak
Spektrophotometer UV-1601	Shimadzu
Sterilbank SG-600E	The Baker Company
Thermomixer 5436	Eppendorf
Vakuumpumpe	ABM
Vakuumzentrifuge Speed Vac Plus SC110A	Savant
Vortex	Scientific Industries
Waage Laboratory LC 4800P	Satorius
Wasserbad GFL 1083	Heinse + Ziller
Zentrifuge 5415 C	Eppendorf
Zentrifuge 5804	Eppendorf
Zentrifuge ROTIXA	Hettich
Zentrifuge Sorval RC5B	DuPont
Zentrifuge Sorval RT 6000D	DuPont

7.2 Abkürzungsverzeichnis

θ	Rekombinationsfraktion
°C	Grad Celcius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
A	Adenin
ADP	Adenosindiphosphat
ALAS1	d-Aminolevulinate Synthase
Ant1	Adenin-Nukleotid-Austauscher
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	Bicinchoninic acid
BCKDC	Branched-Chain α-Ketosäure-Dehydrogenase-Komplex
bp	Basenpaar
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
c	Konzentration
C	Cytosin
CCCP	Carbonyl-Cyanid m-Chlorophenylhydrazon
cDNA	komplementäre DNA
CHLC	Cooperative Human Linkage Center
cM	Centi-Morgan
CMT2B1	Charcot-Marie-Tooth Syndrom
CO ₂	Kohlendioxid
DCM	Dilatative Kardiomyopathie
DCM-CD	dilatative Kardiomyopathie mit Reizleitungsstörungen

DES	Desmin-Gen
ddNTP	didesoxy-Nukleosidtriphosphate
DLD	Dihydrolipoamid-Dehydrogenase
DMD	Dystrophingen
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	desoxy-Nukleosidtriphosphate
DTT	Dithiothreitol
EBV	Eppstein-Barr-Virus
ECL	<i>Enhanced Chemical Luminescence</i> -Detektionssystem
EDMD	Emery-Dreifuss Muskeldystrophie
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EJC	exon junction complex
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
EYA4	Gen für <i>eyes absent 4</i>
FAD ⁺	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FCS	fecal calf serum
FPLD	Dunnigan`s familiäre Lipodystrophie
FS	<i>fractional shortening</i>
g	Erdschleunigung
G	Guanin
GCS	Glycin-Abbau-System
GFP	grün fluoreszierendes Protein
GTC	Guanidinisothiocyanat
INM	inneren Kernmembran
INT	p-Iodonitrotetrazolium-Lösung
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
KDC	α -Ketoglutarat-Dehydrogenase-Komplex
KSS	Kearns-Sayre-Syndrom
L	Wahrscheinlichkeit
LAP	Lamina-assoziierten Proteinen
LB-Medium	<i>lysogeny broth</i> -Medium
LCL	lymphoblastoide Zelllinie
LGMD	Gliedergürtel Muskeldystrophie
LHON	Lebersche hereditäre Optikusneuroretinopathie
LMNA	Lamingen
LOD	<i>Logarithms of the Odds</i>
LVEED	linksventrikulärer enddiastolischer Durchmesser
M	Molar
mA	Milliamper
MAD	Mandibuloakral Dysplasie
MCP	Mitochondriopathien
mg	Milligramm
min	Minuten
ml	Milliliter
MLP	Muskel-spezifisches LIM Protein
mm	Millimeter

mM	Millimolar
MnSOD	Mn-Superoxid-Dismutase
mtDNA	mitochondriale DNA
MYH7	Myosin schwere Kette 7
NAD ⁺	Nikotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid
ng	Nanogramm
NLS	Zellkernlokalisierungssignal
nm	Nanometer
NMD	<i>nonsense-mediated mRNA decay</i>
OD	Optische Dichte
OMIM	<i>Online Mendelian in Man</i>
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphate-buffered Saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDC	Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex
P _i	anorganisches Phosphat
PKA	Proteinkinase A
PLN	Phospholamban-Gen
PTC	vorzeitiges Stop-Codon
RNA	Ribonukleinsäure
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SERCA2	sarkoplasmatische Ca ²⁺ -ATPase
SKOV	Ovarkarzinom Zelllinie
SR	sarkoplasmatisches Reticulum
SNP	Einzelnucleotid-Polymorphismus
T	Thymin
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TBS	Tris-buffered Saline
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tfam	mitochondrialer Transkriptionsfaktor
TnC, TnT, TnI	Troponin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
tRNA	Transfer-Ribonukleinsäure
U	Units
UTR	untranslatierte Region
VCL	Metavinculin-Gen
v/v	<i>volume / volume</i>
w/v	<i>weight / volume</i>
Z	LOD-Score

7.3 Internetverzeichnis

10. Version des Weberscreeningsets
<ftp://ftp.resgen.com/pub/mappairs/humanset/Version10.txt>
- Bestimmung von Restriktionsschnittstellen
www.restrictionmapper.org/
- BRENDA – Enzymdatenbank
<http://www.brenda.uni-koeln.de/index.php4>
- Datenbank zur Genexpression
<http://symatlas.gnf.org/SymAtlas/>
- GeneCards
www.genecards.org/index.shtml
- Internationales HapMap Projekt
<http://snp.cshl.org/>
- Kopplungsanalyse User Guide
<http://linkage.rockefeller.edu/soft/linkage/right.html>
- Lamin-Primer
<http://genetics.med.harvard.edu/~seidman/lamin.html>
- MERLIN-Haplotypenanalyse
www.sph.umich.edu/csg/abecasis/Merlin/index.html
- Mitochondriales Genom
www.mitomap.org/
- National Center for Biotechnological Information
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
- NCBI SNP-Datenbank
www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/
- OMIM-Datenbank
www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=OMIM
- Programm zur Auswahl von Primern
<http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3.cgi>
- The Genome Database
www.gdb.org
- The Wellcome Trust Sanger Institute
www.ensembl.org
- UCSC Genome Bioinformatics
www.genome.ucsc.edu/

7.4 Publikationsverzeichnis

7.4.1 Originalarbeiten

SCHÖNBERGER J, KÜHLER L, MARTINS E, LINDNER TH, SILVA-CARDOSO J, ZIMMER M.

A novel locus for autosomal-dominant dilated cardiomyopathy maps to chromosome 7q22.3-31.1. *Hum Genet.* 118(3-4):451-7, 2005

KÜHLER L, SCHÖNBERGER J, BAYAS A, REINERS K, STÖRK S, STRÖBEL P, ANGERMANN C, ERTL G, ZIMMER M

A novel truncating mutation in LMNA leads to nonsense-mediated decay and causes early atrial fibrillation, stroke, AV Block, dilated cardiomyopathy and limb girdle muscular dystrophy through haploinsufficiency (*in preparation*)

7.4.2 Poster

A novel locus for autosomal-dominant dilated cardiomyopathy maps to chromosome 7q22.3-31.1.

Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Humangenetik, Halle (2005)

A novel truncating mutation in LMNA leads to nonsense-mediated decay and causes early atrial fibrillation, stroke, AV Block, dilated cardiomyopathy and limb girdle muscular dystrophy through haploinsufficiency

4th Dutch German Meeting, Utrecht (2006)

Name
Geburtsdatum
Geburtsort
Anschrift

1984 – 1988
1988 – 1997

Mai 1998 – März 2003

seit Nov 2003

Lebenslauf

Persönliche Daten

Leif Heinrich Kühler
14. Dezember 1977
Esslingen am Neckar
Fraunhoferstr. 4 (App. 27)
97076 Würzburg
Tel.: 0931 – 3 59 62 47
E-Mail: leifkuhler@gmx.net

Schulbildung

Martin-Luther-Grundschule in Brilon
Gymnasium Petrinum in Brilon
Abitur (Note 2,0) mit den Leistungs-
fächern Biologie und Mathematik

Hochschulausbildung

Studium der Biologie (Diplom) an der
Julius-Maximilian-Universität Würzburg

Dissertation am Institut für Klinische
Biochemie und Pathobiochemie der
Universitätsklinik Würzburg
Thema: Identifizierung von genetischen
Defekten bei familiärer dilatativer
Kardiomyopathie

Praktische Erfahrungen

Jun – Sep 2000	Freiwilliges Praktikum im Institut für Klinische Biochemie an der Universitätsklinik Würzburg
Mai – Aug 2001	Praktikum bei GPC-Biotech (Martinsried-München)
Apr – Okt 2003	Praktikum am Unispital Zürich im Institut für Gastroenterologie

Sonstiges

Jul 1997 – Apr 1998 2000/2001	(Bundes-)Wehrdienst Betreuung von Erstsemesterpraktika der Biologen und Mediziner
Sprachen	Englisch (gut) Französisch (Schulkenntnisse)
Freizeit	Mannschaftssport Tennis (regelmäßig) Mannschaftssport Fußball (unregelmäßig)

Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand von November 2003 bis Februar 2007 an der Medizinischen Universitätsklinik Würzburg im Institut für Klinische Biochemie und Pathobiochemie.

Mein Dank gilt Prof. Dr. Michael Zimmer, der mich im Zusammenhang mit dieser Arbeit fachlich unterstützt und inspiriert hat sowie die Forschung zu einer spannenden und angenehmen Tätigkeit machte. Ich danke ihm auch für die freundschaftliche Betreuung dieser Arbeit, für die Korrekturen von anscheinend nicht immer schönen Vorabversionen und seine beharrlichen Versuche, Realismus in Optimismus zu verwandeln.

Herrn Prof. Dr. Georg Krohne danke ich für die Übernahme des Koreferats, für die Hilfe bei den elektronenmikroskopischen Aufnahmen und für die konstruktiven Anregungen bei der Arbeit an dem „Laminprojekt“.

Auch einen Dank an Herrn Dr. Peter Koth für das Interesse an der Arbeit und die Korrektur der Arbeit.

Ebenfalls einen Dank an die Familienmitglieder, die ihr Blut für wissenschaftliche Zwecke gespendet haben, was diese Arbeit erst ermöglichte.

Allen meinen Kollegen und Mitstreitern bin ich für ihre Hilfsbereitschaft und für das angenehme Arbeitsklima am Institut sehr dankbar. In besonderem Maße zur guten Atmosphäre haben durch ihre unverwechselbare Art Gunnar, Jost, und Elke beigetragen. Gunnar danke ich für die Unterstützung bei der praktischen Arbeit, sowie die freundliche und entspannte Atmosphäre im Labor. Jost für die hilfreichen Diskussionen und seine immer motivierende und aufmunternde Art. Elke für Ihre Begleitung in die Mensa und die vielen Gespräche, mit denen sie mich vom Laboralltag ablenkt hat.

Ich danke meinen Freunden, in der Hoffnung, dass unsere Freundschaft noch lange bestehen möge. Meinen Kommilitonen und Kommilitoninnen, insbesondere Ange, Rike, Sabine, Florian und Alex für die unvergessliche Studienzeit und dafür, dass in München immer ein freies Bett und ein kühles

Bier für mich bereit standen. Domie für diverse kurzweilige Abende jenseits vom Thresen im Nachtwächter. Sibbi für die langjährige Freundschaft seit der Schulzeit und die gemeinsam verbrachte Zeit, in der ich mir Abwechslung und Ausgleich vom Arbeitsalltag verschaffen konnte.

Ein ganz besonderer Dank geht an meinen Bruder und meine Mutter, in Erinnerung an meinen Vater und Mi, die mich auf meinem Lebensweg begleitet und unterstützt haben.

Leif

Hiermit versichere ich, dass die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst wurde und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt wurden.

Leif Kühler

Würzburg, den 01. März 2007