

**LMNA–GEENITUTKIMUS FAMILIAALISTA DILATOIVAA
KARDIOMYOPATIAA SAIRASTAVILLA POTILAILLA**

Samu Becker
Syventävien opintojen kirjallinen työ
Tampereen yliopisto
Lääketieteen yksikkö
Tammikuu 2015

Tampereen yliopisto
Lääketieteen yksikkö
Oikeuslääketiede/Kardiologia

SAMU BECKER: LMNA–GEENITUTKIMUS FAMILIAALISTA DILATOIVAA KARDIOMYOPATIAA SAIRASTAVILLA POTILAILLA

Kirjallinen työ, 21 s.
Ohjaaja: dosentti Olli Kajander

Tammikuu 2015

Avainsanat: perinnölliset sydänsairaudet, DCM, FDC, lamiini A/C, DNA, PCR, sekvensointi

Dilatoiva kardiomyopatia (DCM) on sydänlihaksen sairaus, jolle on tyypillistä sydämen vasemman kammion laajeneminen ja systolinen vajaatoiminta. Taudin perinnöllistä muotoa kutsutaan familiaaliseksi dilatoivaksi kardiomyopatiaksi (FDC).

LMNA-geeni (*LMNA*) koodittaa tumakelmun sisäpinnalla olevan tumalevyn proteiineja, lamiineja. Geeni koostuu 12 eksonista. *LMNA*:sta on löydetty merkittävä osa FDC:en liittyvistä geenivirheistä. Suomalaisissa tutkimuksissa juuri *LMNA*:sta on löydetty eniten geenivirheitä DCM -potilailla.

Tämän tutkimuksen potilasaineisto koostuu Pirkanmaan sairaanhoitopiirin kardiomyopatiarekisterin FDC:tä sairastavista potilaista. Tavoitteena oli selvittää potilaiden geeniperimää ja mahdollisia geenivirheitä *LMNA*:ssa. Tutkimuksessa potilaiden verinäytteistä eristetyistä DNA:sta sekvensoitiin *LMNA*.

Geenivirheitä löytyi sekä eksoneista 7 ja 10 että intronista 8. Kaikki geenivirheet olivat pistemutaatioita. Eksonien pistemutaatiot eivät aiheuttaneet aminohappovaihdosta, joten niillä ei liene kliinistä merkitystä. Intronissa 8 todettu pistemutaatio on aiemmin yksittäisessä tutkimuksessa havaittu olevan itsenäinen riskitekijä DCM:lle.

Tulosten perusteella voidaan olettaa, ettei *LMNA*:ssa ole yleisesti esiintyvää valtamutaatiota Pirkanmaan DCM -potilailla. Tosin toisenlaisella potilasvalinnalla saattaisi tuloskin olla toisenlainen. Tulosten perusteella on myös mahdollista, että intronissa kahdeksan sijaitseva geenivirhe on kliinisesti merkittävä DCM:n riskitekijä myös suomalaisilla potilailla. Asia vaatii kuitenkin lisää tutkimustietoa.

Sisällysluettelo

1. Johdanto	1
2. Kirjallisuuskatsaus	2
2.1 Dilatoiva kardiomyopatia	2
2.1.1 Epidemiologia	2
2.1.2 Etiologia	2
2.1.3 Patofysiologia ja oireet	4
2.1.4 Patologia	4
2.1.5 Diagnostiikka	5
2.1.6 Hoito	6
2.2 LMNA, lamiinit ja laminopatiat	7
2.2.1 LMNA	7
2.2.2 Lamiinit	8
2.2.3 LMNA:n mutaatiot ja laminopatiat	9
2.3 FDC ja LMNA	9
3. Tutkimusmetodi	10
3.1 Aineisto ja menetelmät	10
3.1.1 DNA:n eristys	11
3.1.2 PCR	11
3.1.3 Puhdistus	13
3.1.4 Sekvensointi ja saostus	13
3.1.5 Sekvenssien tulkinta	14
3.2 Eettiset näkökulmat	14
4. Tulokset	14
5. Pohdinta	16
Lähdeluettelo	18

1. JOHDANTO

Kardiomyopatia eli sydänlihaskasvatus on yhteisnimitys sydänlihaksen sairauksille, jotka aiheuttavat sydämessä rakennepoikkeavuuksia ja sen toiminnan häiriintymistä. Sydänlihaksen toiminnan häiriintyminen voi edetessään olla haitaksi verenkiertoelimistön toiminnalle ja siten myös koko kehon toiminnalle. Sydänlihaksen toimintahäiriön yleisin ilmenemismuoto on sydämen vajaatoiminta. Myös rytmihäiriöt ovat yleisiä.

Vuoden 2008 Euroopan kardiologiyhdistyksen, ehdotuksen mukaisesti kardiomyopatiat luokitellaan fenotyyppinsä perusteella viiteen eri tautiluokkaan: dilatoivaan-, hypertrofiseen-, restriktiiviseen- ja oikean kammion kardiomyopatiaan sekä edellisiin kategorioihin sopimattomiin luokittelemattomiin kardiomyopatioihin. Luokittelu perustuu eri kardiomyopatioiden erilaisiin fenotyyppien funktionaalisiin ja morfologisiin ominaisuuksiin. (1)

Dilatoivaa kardiomyopatiaa (DCM, *engl. dilated cardiomyopathy*) sairastavilla potilailla sydämen vasemman kammion tilavuus kasvaa ja systolinen funktio heikkenee. Näillä potilailla on suurentunut riski sairastua sydämen vajaatoimintaan. Akuutti dekompensoitu sydämen vajaatoiminta voi olla hengenvaarallinen tila. Muita henkeä uhkaavia komplikaatioita DCM-potilailla voivat olla mm. kammiooperäiset rytmihäiriöt, AV-katkos ja synkopee. Sydänperäisen äkkikuoleman riski on myös merkittävästi suurentunut. (2)

Tautimääritelmän mukaisesti vasemman kammion toiminnan heikkeneminen ei saa selittyä muulla sydäntä kuormittavalla tai vahingoittavalla tekijällä kuten hypertensiolla, läppävialla tai sepelvaltimotaudilla (1).

DCM:n perinnöllisen muodon, familiaalisen eli suvuttain esiintyvän dilatoivan kardiomyopatian (FDC, *engl. familial dilated cardiomyopathy*), osuus DCM:aa sairastavista on merkittävä. Nykytiedon mukaan jopa puolet idiopaattisista DCM-tapauksista ovat familiaalisia (3). FDC:n geneettisen taustan hajanaisuudesta kertoo yli 40 tunnistettua tautigeeniä.

LMNA:n on arvioitu olevan hyvin merkittävä geeni FDC:n taustalla - se on yksi eniten mutaatioita sisältävistä geeneistä DCM-potilailla (4,5). *LMNA* koodaa tumakelmin rakenneproteiineja, lamiineja, joilla on runsaasti myös toiminnallisia ominaisuuksia. (6)

DCM on merkittävä sairastavuuden ja kuolleisuuden aiheuttaja. Geenivirhe *LMNA*:ssa on yhteydessä huonoon ennusteeseen DCM-potilailla. Koska *LMNA*:n mutaatioiden penetranssi on usein lähes 100 %, niin oireettomien geenivirheen kantajien ja jo sairastuneiden mahdollisimman varhainen tunnistaminen on tärkeää. (7)

Tutkimuksen tarkoituksena oli selvittää FDC:n taustalla olevaa geeniperimää suomalaisilla DCM-potilailla tunnistamalla mahdolliset geenivirheet *LMNA*:ssa, josta on aiemmissa suomalaisissa tutkimuksissa löydetty geenivirheitä DCM-potilailla (8,9). Pirkanmaan sairaanhoitopiirin DCM-potilailta ei aiemmin ole löydetty periytyvää tautimuotoa selittävää valtamutaatiota (10). Tästä syystä tutkimus tuo tärkeää lisätietoa aiheesta.

Tutkimusmenetelmänä käytettiin *LMNA*:n sekvensointia tutkimuspotilaiden verestä eristetystä DNA:sta. Automaattisen DNA:n sekvensoinnin tulosten analysointi suoritettiin tietokoneohjelmien avulla.

2. KIRJALLISUUSKATSAUS

2.1 Dilatoiva kardiomyopatia

2.1.1 Epidemiologia

DCM on kardiomyopatioista yleisin. Sen osuus on arviolta 60 % kaikista kardiomyopatioista (5). DCM:n esiintyvyys on länsimaissa aikuisväestössä 1:2500 ja uusien tautitapausten ilmaantuvuus vuodessa 5-10 tapausta per 100 000 ihmistä. FDC:n osuuden on arvioitu olevan eri tutkimusten mukaan 20-48 %:a kaikista DCM-tapauksista (3,11-14). Suomessa DCM:n vallitsevuus on aikuisväestössä 36,5 tapausta per 100 000 ihmistä (15).

2.1.2 Etiologia

DCM:n taustalla voi olla useita eri aiheuttajia (Taulukko 1). Joskus on kyse usean tekijän yhteisvaikutuksesta. Maailman terveysjärjestö WHO:n v. 1995 julkaisemien kriteerien mukaan sairaus voidaan jakaa idiopaattiseen, familiaaliseen tai geneettiseen, virus- tai autoimmuuniperäiseen ja alkoholin tai muun toksisen tekijän aiheuttamaan muotoon. (16) Myös uudempia kardiomyopatioiden

luokitteluja/kriteeristöjä on esitetty mm. Euroopan kardiologiseuran (ESC, *European Society of Cardiology*) ja vastaavan amerikkalaisen yhdistyksen (AHA, *American Heart Association*) puolesta. Vaikka nämä poikkeavatkin osin toisistaan, niin kaikkiaan yksimielisiä ollaan siitä, että DCM nimitystä käytetään, kun syy on sydänlihaksessa eikä aiheudu sydänlihaksen iskemiasta tai kuormitusolosuhteiden muutoksesta. (17-19)

Taudin perinnöllinen muoto FDC on geneettiseltä taustaltaan hyvin monitekijäinen. Sen periytyminen voi noudattaa autosomaalista vallitsevaa, autosomaalista väistyvää, X-kromosomaalista tai mitokondriotauteihin liittyvää maternaalista periytymistapaa. Autosomaalinen vallitseva on yleisin periytymistapa. (15)

DCM:n periytyvä muoto aiheutuu muutoksista pääasiassa kahden eri proteiiniryhmän geeneissä. Nämä geenit koodaavat solun tukirakenteiden ja lihassarkomeerien proteiineja (2). Siten muutokset sydänlihaksen normaalissa voimantuotossa ja voimantäilyksessä, metaboliset ja mekanosensoriset poikkeavuudet sekä häiriintynyt kalsiumtasapaino ovat mekanismeja, joiden on havaittu olevan yhteydessä DCM:n syntyyn (20,21). Suurin osa näihin

mekanismeihin liittyvistä geenimutaatioista on havaittu olevan solun tukirankaa ja lihassolun supistumisesta vastaavaa osaa, sarkomeeria, koodaavissa geeneissä. Solun tukirangan proteiinien toiminnanhäiriön seurauksena on yleensä puutos voimantäilyksessä, kun taas sarkomeerin toiminnanhäiriöissä puutos on tavallisesti voimantuotossa. Mutaatiot sarkomeeria koodittavissa geeneissä voivat aiheuttaa sekä dilatoivaa että hypertrofista kardiomyopatiaa. (22)

Jos potilaalla on DCM, johon yhdistyy eteiskammiosolmukkeen (AV)-katkos tai luurankolihasmyopia on yleisimmin taustalla LMNA:n mutaatio (23,24). Lamiinit ovat tumaa ympäröivän kaksoiskalvon sisemmällä kalvolla olevan proteiinirakenteen, tumalevyn rakenneyksiköitä. Lamiineja on eri alatyyppejä, joista A- ja C-tyyppejä esiintyy sekä sydänlihaksessa että poikkijuovaisessa

Taulukko 1. DCM:n syitä ja syntyyn myötävaikuttavia tekijöitä (15).

Geneettiset syyt	Familiaalinen dilatoiva kardiomyopatia Lihasdystrofioihin liittyvä kardiomyopatia Mitokondriotaudit Muuhun perinnölliseen sairauteen liittyvä
Infektiot	Virukset Bakteerit Parasiitit
Toksiset	Alkoholi Lääkkeaineet Raskasmetallit Työperäinen altistuminen hiilivedyille tai arseeniyhdisteille
Sädehoito	Rintakehän alueelle
Metaboliset	Puutostilat Endokriiniset Lihavuus Uremia
Peripartaalinen kardiomyopatia	
Jatkuva takykardia	esim. nopea eteisvärinä
Systeemisairaudet	Kollageenisairaudet ja vaskuliitit Sarkoidoosi

lihaksessa.

Ionikanavien toiminta on oleellista sydämen elektrofysiologisessa toiminnassa. Häiriöt ionikanavien toiminnassa voivat myös johtaa DCM:n syntyyn. Tyypillisesti ionikanavien toiminnan häiriintyessä ilmenee aluksi erityyppisiä rytmihäiriöitä ennen kuin ilmenee DCM:lle tyypillisiä muutoksia sydänlihaksessa. Monet ionikanavat toimivat yhdessä lihassolukalvon ja sarkomeerin proteiinien kanssa. Tämä tieto auttaa havainnollistamaan ionikanavien toimintahäiriöiden ja DCM:n yhteyttä. (25,26)

Vasemman kammion toimintaa heikentävät infektiot voivat myös aiheuttaa DCM:lle tyypillisen fenotyypin. Tällainen infektio voi esimerkiksi olla viruksen aiheuttama krooninen myokardiitti eli sydänlihastulehdus. Myös bakteeriperäiset, sienten aiheuttamat, parasiittiset, rikettsiaaliset ja spirotrikeaali -infektiotkin voivat aiheuttaa vastaavia muutoksia sydämessä. (2)

Monet toksiset aineet voivat ihmiskehoon joutuessaan aiheuttaa DCM:lle tyypillisen taudinkuvan. Esimerkiksi pitkäaikainen huumeiden tai alkoholin käyttö voi johtaa taudin syntyyn. Alkoholin aiheuttama kardiomyopatia on poissulkudiagnoosi. Se liittyy päivittäiseen alkoholin käyttöön ja on riippuvainen käytön määrästä ja kestosta. Niin akuutti, kuin krooninenkin alkoholin käyttö heikentää sydämen supistusvoimaa. Tarkkaa mekanismia ei tunneta. Syöpälääkkeinä käytetyt antrasykliinit voivat iästä riippumatta aiheuttaa dilatoivan kardiomyopatian ja sydämen toiminnan pettämisen. (2)

2.1.3 Patofysiologia ja oireet

DCM:ssa rakenteelliset muutokset ovat havaittavissa selkeimmin sydänsairauden loppuvaiheessa. Tällöin vasen kammi on laajentunut ja pyöristynyt, jolloin sen tilavuus on suurentunut. Tästä seuraa se, että vasen kammi ei pysty pumppaamaan verta tehokkaasti eteenpäin aorttaan ja edelleen systeemiverenkiertoon. Kammioon pakkautuva veri aiheuttaa suurentuneen rasituksen kammion seinämiä kohtaan. Kammion seinämät sopeutuvat rasitukseen ja niiden kokonaismassa kasvaa. Elimistö pyrkii kompensoimaan tehotonta verenkiertoa ja siitä syntyvät tyypilliset sydämen systolisen vajaatoiminnan oireet: hengenahdistus, väsymys, tykyttely, viileä periferia ja muut sympatikotonian oireet. Kammion toiminnan häiriöön saattaa vielä lisäksi liittyä mitraaliläpän vuotoa ja kammioperäisiä rytmihäiriöitä. Kroonisen systolisen vajaatoiminnan ohella, ja usein jo ennen sitä, esiintyy myös diastolinen vajaatoiminta ja sydämen oikean puolen toiminnan häiriöitä. Lisäksi DCM on kehittyneissä maissa yleisin sydänperäisen äkkikuoleman syy (2).

2.1.4 Patologia

DCM:aan liittyy sydänlihaksen uudelleenmuotoutuminen (engl. *remodelling*). Se voi kohdistua toiseen tai molempiin sydämen kammioihin. Remodelling johtaa muutoksiin kammion avaruudellisessa muodossa ja lihassäikeiden järjestäytymisessä. Makroskooppisesti on nähtävissä sydämen kammioiden laajeneminen eteisiä enemmän. Yleensä sydänläppien ja sepelvaltimoiden rakenne eivät poikkea tavanomaisesta. Joskus sydänlokeroissa voidaan nähdä verihyytymiä, trombeja. Mikroskooppinen tutkimus paljastaa interstitiaalista ja perivaskulaarista fibroosia ja toisinaan myös kuolioalueita ja soluinfiltraatteja sydänlihaskudoksessa. Sydänlihassolujen koko voi vaihdella. Toisaalta solut voivat olla suurentuneita eli hypertrofioituneita, toisaalta myös surkastuneita eli atrofioituneita. (2)

2.1.5 Diagnostiikka

Usein ennen DCM:n diagnosointia todetaan potilaalla sydämen vajaatoimintaan viittaava taudinkuva, jonka perusteella aloitetaan etiologiset selvittelyt.

Sydämen vajaatoiminta on oireyhtymä, jonka taustalla on jokin sydän- ja verenkiertoelimistön sairaus sekä mahdollisesti muita myötävaikuttavia sairauksia ja tekijöitä. Sydämen vajaatoiminnan diagnostiikassa pyritään tunnistamaan oireyhtymän olemassaolo, vajaatoiminnan taustalla oleva sydänsairaus tai sairaudet sekä myötävaikuttavat sairaudet ja tilat.

DCM -diagnoosi tehdään potilaan oireiden, kliinisen kuvan, laboratoriotutkimusten, kuvantamistutkimusten ja kajoavien tutkimusten perusteella. Ensimmäiseksi diagnostiikassa on poissuljettava mm. verenpainetauti ja sepelvaltimotauti sydämen vajaatoiminnan taustalta. Usein DCM etenee hitaasti ja oireettomasti tiettyyn pisteeseen saakka, ennen kuin sydämen vajaatoiminnan oireet ilmenevät. Joskus esimerkiksi infektio voi laukaista oirekuvan äkillisen pahenemisen. Oireet ovat yleisiä sydämen vajaatoiminnan oireita, joista tavallisimpia ovat yleinen väsymys ja fyysisen suorituskyvyn lasku, hengenahdistus, turvotukset ja rytmihäiriöt. Yleisimmät löydökset ovat sydämestä kuuluva sivuääni, keuhkojen rahinat ja alaraajaturvotukset.

Yleisin käytetty laboratoriotutkimus lienee sydämen kammioista erittyvän natriureettisen peptidin, BNP:n pitoisuuden mittaus verinäytteestä. BNP:n nousu on yhteydessä vasemman kammion heikentyneeseen systoliseen funktioon, hypertrofiaan, täyttöpaineen kohoamiseen ja sydänlihaskemiaan (27). Lisäksi sekundaaristen taudinaiheuttajien poissulku testien avulla on suotavaa.

EKG:ssa voi näkyä sinustakykardia, ST-T-muutoksia, Q-aaltoja, johtumishäiriöitä, haarakatkoksia, vasemman kammion hypertrofia, kammioarytmia tai ektopia, kuten esimerkiksi supraventrikulaarinen takykardia ja eteisvärinä.

Thoraxin röntgenkuvassa nähdään sydänvarjon suureneminen ja/tai keuhkojen verisuonikuvioituksen lisääntyminen.

Tärkeä tutkimus on sydämen ultraäänitutkimus, jossa tyypillisiä löydöksiä ovat mm. laajentunut vasen kammio, alentunut ejektiofraktio ja mahdollinen mitraaliläpän vuoto. Ultraääntä voidaan käyttää myös hoitovasteen arvioinnissa, koska tutkimus on nopea ja potilasta vähän rasittava.

Iskeemisen sydänsairauden tutkimiseen voidaan käyttää tapauskohtaisesti harkiten kliinistä rasisuskoetta tai sydänlihaksen perfuusion isotooppikuvausta.

Diagnostinen sepelvaltimoiden varjoainekuvaus on yleensä aiheellinen vähintään keski-ikäiselle potilaalle. Muita kajoavia sydäntutkimuksia, kuten sydänlihaksen koepalan ottoa tai elektrofysiologista tutkimusta, harkitaan tapauskohtaisesti, yleensä erityisen kysymyksenasettelun puitteissa.

FDC diagnoosi voidaan asettaa kun potilaan lähisuvussa vähintään kahdella henkilöllä on todettu IDC tai selittämätön äkkikuolema alle 35-vuotiaana. Diagnostiikkaa vaikeuttaa monen potilaan tietämättömyys taudin esiintymisestä heidän suvussaan. Lisäongelma on myös taudin vaihteleva penetranssi iän ja yksilöiden osalta jopa perheen sisällä. Myös muut kammioiden dilatoitumista aiheuttavat tilat, kuten esimerkiksi sepelvaltimotauti tai läppävika saattaa vaikuttaa samanaikaisesti geneettisen DCM:n kanssa, jolloin FDC:n diagnosointi vaikeutuu.

2.1.6 Hoito

DCM:n hoito kohdistuu pääasiassa vajaatoimintaoireiden hoitoon, taudin ennusteen parantamiseen sekä komplikaatioiden ja taudin etenemisen ehkäisemiseen.

Lääkehoito on pääroolissa hoidettaessa sydämen systolista vajaatoimintaa tai DCM:aa. Diagnoosin varmistuttua merkittävästä pumppaustoiminnan häiriöstä kärsivien potilaiden tulisi käyttää ACE-estäjiä ja beetasalpaajia, jotka molemmat tutkimusten mukaan parantavat potilaiden ennustetta. Oireenmukaisina lääkkeinä tarvitaan usein nesteenpoistolääkitystä. Muita tapauskohtaisesti käytettäviä lääkkeitä ovat digitalis, ATII- salpaajat, pitkävaikutteiset nitrovalmisteet ja joskus amiodaroni.

Rytmihäiriötahdistimen (ICD-tahdistin) käyttö vähentää kuolleisuutta niillä sydäninfarktin sairastaneilla potilailla, joilla vasemman kammion ejektiofraktio on heikentynyt (28,29). Vastaava suojaava vaikutus on havaittu myös DCM-potilailla (30,31). Vajaatoimintatahdistimen (CRT-tahdistin) käyttö on laajentanut pitkälle edenneen sydämen vajaatoiminnan ja kammioiden johtumishäiriöiden hoitomahdollisuuksia. Synkronoimalla oikean ja vasemman kammion mekaanista toimintaa CRT-tahdistin pystyy lisäämään vasemman kammion täyttöaikaa, vähentämään mitraalivuotoa ja kammioväliseinän liikehäiriötä.

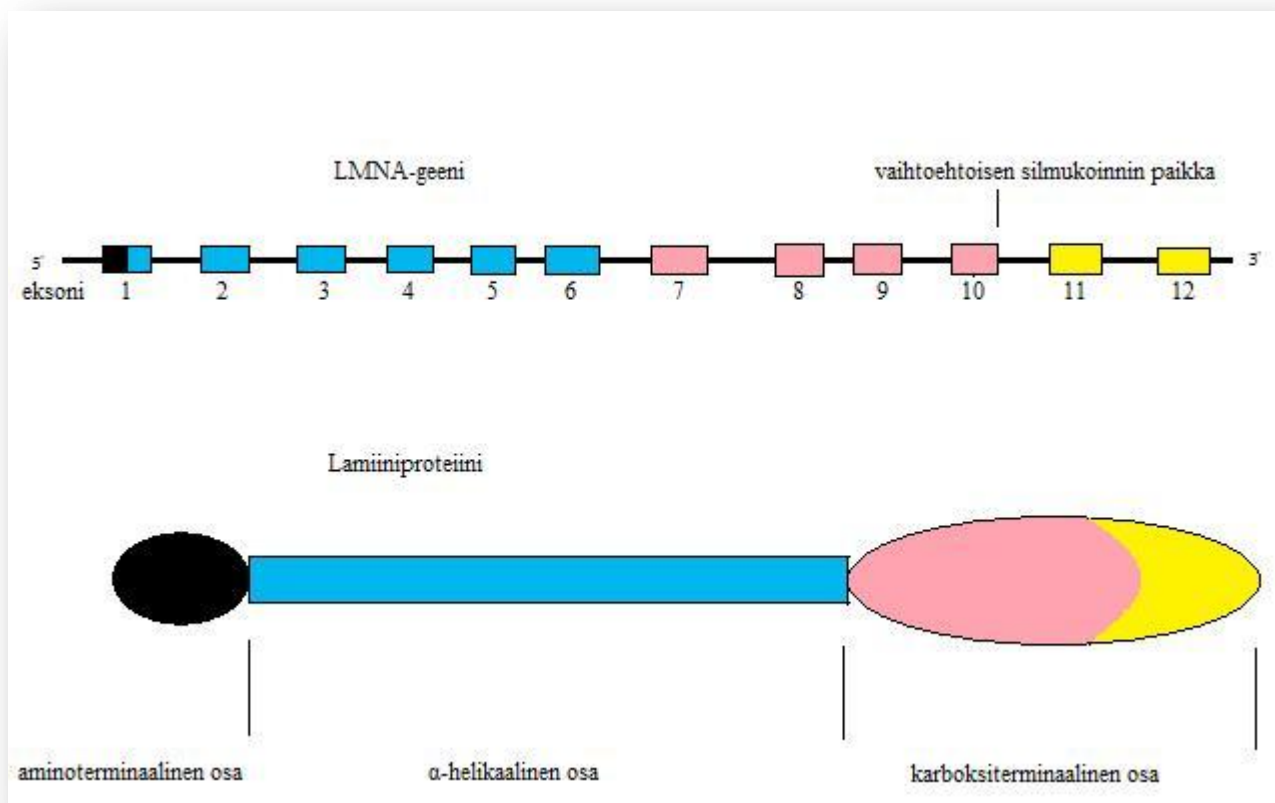
Nuoremmille (yleensä alle 60-vuotiaat) potilaille voidaan harkita sydämensiirtoa, mikäli oirekuva muuttuu erittäin vaikeaksi ja hallitsemattomaksi eikä siirrolle ilmene muita esteitä. Suomessa DCM on yleisin sydämensiirron syy.

Kantasolujen käytön hyödyllisyydestä on saatu näyttöä sydäninfarktin aiheuttaman vasemman kammion systolisen toiminnanhäiriön hoidossa. Siten mielenkiinto kantasolujen käyttöä kohtaan myös loppuvaiheen DCM:n hoidossa on kasvanut. (32)

2.2 LMNA, lamiinit ja laminopatiat

2.2.1 LMNA

LMNA-geeni sijaitsee kromosomissa 1 (1q22). Geeni koostuu 12 eksonista, jotka koodittavat tumakelmun rakenneproteiineja, lamiineja. Geeni tuottaa useita hieman toisistaan poikkeavia proteiineja vaihtoehdoisen silmukoinnin avulla (engl. *alternative splicing*). Sen päätuotteina syntyvät translaatiossa lamiini A ja lamiini C, joita syntyy lähes kaikissa elimistön soluissa. Lamiinien aminohapposekvenssit ovat lähes identtiset; ensimmäiset 566 aminohappoa ovat samat, mutta lamiini C:stä puuttuu aminohappoketjun karboksyylipäästä 98 aminohapon pituinen nukleotidiketju. (Kuva 1.)



Kuva 1. Muokattu lähteestä (33). *LMNA*-geeni ja siitä translaation kautta syntyvä lamiiniproteiini. Lamiinit A ja C poikkeavat toisistaan karboksiterminaaliselta osaltaan. Vaihtoehtoisen silmukoinnin avulla lamiini A:n karboksiterminaalinen osa (vaaleanpunainen + keltainen) on pidempi kuin lamiini C:n (pelkkä vaaleanpunainen).

2.2.2 Lamiinit

Lamiinit ovat eläinkunnan soluissa esiintyviä solun tukirangan osia. Lamiinit muodostavat tumakelmun sisäpinnalle erityisen säieverkoston, joka antaa tumalle mekaanista tukea ja toimii kiinnitysalustana useille proteiimirakenteille ja kromatiinille. Tuman jakautumisessa lamiinien toiminta auttaa kahdentuneen DNA:n jakautumaan eri puolille jakautuvaa solua ja vastaavasti niillä on rooli myös uusien tumien muodostuessa.

Lamiinien on lisäksi havaittu ottavan osaa useisiin perimäainekseen liittyviin tehtäviin, kuten genomien organisoitumiseen, kromatiinin säätelyyn, transkriptioon, DNA:n kahdentumiseen ja DNA:n vaurioiden korjaamiseen. Siten lamiineilla on sekä rakenteellinen että toiminnallinen rooli. (6)

Lamiinit voidaan jakaa A ja B tyyppeihin rakenteensa ja ekspressoitumisensa perusteella. A-tyyppin lamiineista yleisimpiä ovat lamiinit A ja C. Tyyppin A lamiinien ekspressio on kehityksellisesti säädeltyä ja niitä tavataan erilaistuneissa soluissa. Myös B-tyyppin lamiineja esiintyy kaikissa soluissa. Tutkimuksissa on keskitytty A-tyyppin lamiineihin; toistaiseksi vain kahden taudin on todettu liittyvän B-tyyppin lamiinien rakennepoikkeamiin. Yhtenä selityksenä voi olla se että B-tyyppin lamiinit ovat yksilön kehityksen kannalta välttämättömiä. (34)

Lamiinit A ja C luokitellaan tyyppin 5 välikokoisiksi säikeiksi. Nämä säikeet ovat proteiineja, jotka tukevat ja vahvistavat solun rakenteita. Lamiinien A ja C spesifinen sijainti on tumalevyssä, joka on kiinnittynyt kaksikerroksisen tumakelmun sisäkalvoon. Tumalevy on säiejärjestelmä, joka koostuu 10 nm kokoisten lamiinien muodostamasta verkostosta. Se antaa tumalle sen muodon ja yhdistää kromosomeja tumakelmuun. Tumakelmu säätelee molekyylien liikkumista tuman ja soluliman välillä.

2.2.3 LMNA:n mutaatiot ja laminopatiat

LMNA:sta on löydetty yli 200 erilaista mutaatiota, jotka voidaan jakaa fenotyypiltään yli 20 esiintymismuotoon, laminopatiaan (35). Laminopatiat voidaan jakaa neljään osin päällekkäinkin ilmeneviin ryhmiin: poikkijuovaisen lihaksen taudit, lipodystrofia syndroomat, perifeerinen neuropatia ja ikääntymisnopeuden häiriötilat (36). Sydän on ikään kuin laminopatioiden perusosa, sillä lähes kaikilla oireista laminopatiaa sairastavilla on löydettävissä myös sydäimestä jonkinasteinen toiminnan muutos. (7) Esimerkkinä mutaatioiden ilmenemismuotojen päällekkäisyydestä on yhden ja saman nukleotidin deleetio LMNA:ssa, joka voi aiheuttaa kolme erilaista taudinkuvaa ja kliinistä diagnoosia: Emery-Dreifuss lihasdystrofian, hartia-lantio lihasdystrofian ja DCM 1A:n. DCM 1A:han liittyy sydämen rytmihäiriöitä. Identtisen mutaation lisäksi dilatoiva kardiomyopatia on yhteinen nimittäjä näille kolmelle tautimuodolle. Tautia sairastavilla on siten suurentunut riski rytmihäiriöoperäiseen sydänäkkikuolemaan. (37)

2.3 FDC ja LMNA

FDC:n on nykyisin arveltu selittävän jopa puolet idiopaattisista dilatoivista kardiomyopatioista (IDC *engl. idiopathic dilated cardiomyopathy*) (11). LMNA:ssa olevien mutaatioiden on ajateltu aiheuttavan jopa 10 % FDC-tapauksista (38). DCM-potilaiden geneettinen testaus on monin paikoin käytössä, koska mutaatio LMNA:ssa on tärkeä tieto sairauden ennusteen kannalta (7). Yleisesti ottaen mutaatio LMNA:ssa liittyy

pahanlaatuisen taudinkulkuun ja joidenkin mutaatioiden penetranssi lähenee 100 %:a potilaiden ikääntyessä. Eri mutaatiot saattavat johtaa erilaisiin proteiinitoiminnan muutoksiin, jolloin eri mutaatioiden aiheuttamat fysiologiset seuraukset voivat vaihdella dramaattisesti. (39)

LMNA:n mutaatiosta kärsivillä ensimmäinen sydänperäinen löydös on yleensä häiriö johtoratajärjestelmässä. Alkuvaiheessa potilailla tyypillisiä EKG-muutoksia ovat matala amplitudiset P-aallot ja pidentynyt PQ-aika, mutta suhteellisen normaali QRS-kompleksi. Seuraavaksi potilaille tyypillisesti kehittyy eteisvärinä ja DCM. (7) 50 vuoden ikään mennessä yli 60 %:lla potilaista on sydämen vajaatoiminnan oireita (38).

LMNA:n mutaatiosta kärsivillä riski sydänäkkikuolemaan (SCD, engl. *sudden cardiac death*) on merkittävästi suurentunut. Yksittäisen tutkimuksen mukaan sydänperäisen äkkikuoleman riski on 42 % n. 3 vuoden seuranta-aikana (40). Riski on merkittävästi suurempi kuin muilla DCM-potilailla (41).

LMNA:sta on löydetty mutaatioita kaikista eksoneista ja silmukointikohdista (34,42,43). Mutaatiot ovat missense-, nonsense-, silmukointikohta- ja deleetiomutaatioita.

3. TUTKIMUSMETODI

3.1 Aineisto ja menetelmät

Tutkimusaineisto pohjautuu TAYS Sydänsairaalan kardiomyopatiarekisteriin. Rekisteriin on kerätty vuosina 2005-2010 verinäytteitä potilaista, joilla on todettu DCM. Tutkimukseen valittiin rekisteristä 20 potilasta, joilla on vähintään yksi DCM:aa sairastava sukulainen. Tutkimuspotilaiden verinäytteistä eristettiin DNA:ta. DNA:sta monistettiin tutkimusta varten suunniteltujen alukkeiden (engl. *primer*) avulla *LMNA*:ta. Geenin monistamisessa käytettiin PCR-menetelmää (engl. *polymerase chain-reaction*). PCR-tuote puhdistettiin ja käsiteltiin sekvensointireaktiota varten. Lopuksi PCR-tuotteesta määritettiin emäsjärjestys koneellisesti. Sekvensointitulokset analysoitiin tietokoneohjelmien avulla (Applied Biosystems®:n Sequence Scanner v1.0® ja DNASTAR®:n SeqMan®). Tutkimuksessa sekvensoitiin yksitoista *LMNA*:n kahdestatoista eksonista. Eksonin 5 sekvensointireaktiota ei saatu toimimaan. Tutkimustulos perustuu siten eksoneiden 1-4 ja 6-12 sekvenssidataan.

3.1.1 DNA:n eristys

Verinäytteet käsiteltiin Tampereen Yliopiston oikeuslääketieteen laboratoriossa. Veren valkosoluista eristettiin DNA:ta suolasaostusmenetelmällä, joka perustuu Lahirin ja Nurnbergerin artikkeliin (44).

EDTA-putkiin kerätyistä verinäytteistä siirrettiin 5 ml verta 15 ml:n sentrifugiputkiin. Putkiin lisättiin 5 ml TKM-1 liuosta ja 125 µl 2-prosenttista Triton™X-100-liuosta, jonka jälkeen sekoitus ja sentrifugointi 2200 rpm:lla 10 minuutin ajan. Seuraavaksi kaadettiin pinnalle jäänyt supernatantti pois ja jäljelle jäi pelletti putkien pohjalle. Lisättiin uudelleen 5 ml TKM-1-liuosta, sitten sekoitus ja sentrifugointi 10 min. Tämä toistettiin 1-2 kertaa, kunnes liuos kirkasta. Sitten lisättiin pestyyn pellettiin 800 µl TKM-2-liuosta ja 50 µl 10-prosenttista SDS:aa. Sitten sekoitus ja liuoksen siirto 1.5 ml:n mikrosentrifuugiputkeen. Tämän jälkeen putket laitettiin +55-asteiseen vesihauteeseen inkuboitumaan 10 minuutiksi. Tämän jälkeen putkiin lisättiin 300 µl 6-M NaCl:a ja perään sekoitus. Liuos sentrifugointi 13200 rpm:lla 20 minuutin ajan. Seuraavaksi otettiin 1 ml supernatanttia talteen 5 ml:n steriileihin muoviputkiin. Supernatanttiin lisättiin 2 ml -20-asteista Aa-etanolia. Seuraavassa vaiheessa saostunut DNA – rihmasto kerättiin pyörittämällä viljelysauvaa putkessa ja sauvat vielä huuhdeltiin hyvin -20-asteisella 70-prosenttisellä Aa:lla. Tämän jälkeen suoritettiin sauvojen ilmakeuhkaus 15 minuutin ajan. Sitten liuotettiin DNA muovisauvoista 500 µl:aan TE-puskuria. Tätä liuosta lämmitettiin 15 minuutin ajan +65-asteessa. Lopuksi tehtiin laimennus 1:20 puskuriliuoksella siten, että lopputuotetta yhteensä 200 µl.

3.1.2 PCR

PCR on molekyylibiologian menetelmä, jossa jo pienestä määrästä DNA:ta saadaan monistettua miljoonia kopioita vain parissa tunnissa. PCR-tekniikkaa käytetään moniin tarkoituksiin, muun muassa perinnöllisten sairauksien etsimiseen, yksilöiden tunnistamiseen geneettisten sormenjälkien avulla, infektiosairauksien diagnosointiin ja geenien kloonamiseen.

PCR perustuu toistuviin lämmitys-viilennys sykleihin. Kuumennettaessa reaktioseos n. 95 asteeseen DNA-kaksoisjuosteet erkanevat toisistaan (denaturaatiovaihe), jolloin syntyy yksisäikeistä templaatti-DNA:ta, joka toimii uuden synteessin mallina. Tämän jälkeen seuraa annealing-vaihe (primereiden kiinnittymisvaihe), jossa lämpötila lasketaan +48 - +72 asteeseen. Siinä monistettavaa DNA-sekvenssiä varten suunnitellut lyhyet yksijuosteiset nukleotidisekvenssit eli alukkeet kiinnittyvät templaatti-DNA:han. Reaktioseosta

viilennettäessä primerit kiinnittyvät DNA:han. Primerit toimivat alkukohtana DNA-polymeraasin suorittamalle pidennysvaiheelle, joka tapahtuu +72 asteessa. Siinä lämpötilassa DNA-polymeraasientsyymi aktivoituu ja alkaa liittää emäksiä alukseen jatkeeksi emäsparisäännön mukaisesti (pidennysvaihe). Kun tätä lämmitys-viilennys sykliä toistetaan, niin myös denaturaatio, annealing ja pidennysvaiheet toistuvat. Jokaisen syklin jälkeen DNA kaksinkertaistuu eli DNA:n määrä kasvaa eksponentiaalisesti.

PCR-reaktion tilavuus on useimmiten hyvin pieni, noin 10–150 µl. Useimmiten monistettavan alueen koko on alle 10 kbp (kbp=kiloemäspari=1000 emäsparia), mutta reaktion komponentteja muuttamalla myös jopa 40 kbp:n mittaisten alueiden monistaminen on mahdollista. Yksinkertaisimmillaan tavallinen PCR-reaktio sisältää seuraavat osat: templaatti-DNA, primerit, polymeraasientsyymi, dNTP:t eli deoksinukleotidit, puskuriliuos, kationit. Reaktiot tehdään ohjelmoitavan lämpöblokin avulla.

Tässä tutkimuksessa monistettiin PCR:n avulla LMNA-geeniä. Geeni koostuu 12:sta eksonista. Geenin monistamista varten tarvittiin alukkeita jokaista eksonia varten ja siten jokaisen eksonin monistamista varten tarvitaan oma reaktioseos ja jokainen reaktioseos voi tarvita hieman toisistaan poikkeavat olosuhteet esim. annealing-lämpötilan, kationien määrän tai syklien määrän suhteen.

Seuraavassa tutkimuksessa käytetyt PCR-reaktioseokset ja PCR-ohjelma:

Reaktioseos eksonit 1-4, 6, 10 ja 11: 10x PCR buffer 5 µl, dNTP 5 µl, DMSO 2 µl, aluke F 1 µl, aluke R 1 µl, Hot Start TAQ 0,3 µl, H₂O 28.7 µl, MgCl₂ 5 µl ja lisäksi 2 µl TE-puskuriin liuotettua DNA:ta. Yhteensä 50 µl:n reaktioseos.

PCR-ohjelma: ensin 5 minuutin alkudenaturaatio 94 asteessa ja perään 30 sekunnin denaturaatio 94 asteessa. Sitten annealing 57 asteessa 30 sekuntia, pidennys 72 asteessa 30 sekuntia ja loppupidennys 7 minuuttia 72 asteessa. Lopuksi seokset viilennetään 4 asteeseen säilytystä varten. Sykliä toistettiin 34 kertaa.

Eksoni 7 reaktioseos ja PCR poikkesi edellä mainitusta ainoastaan siten, että annealing lämpötila oli +58 astetta, MgCl₂:a 6 µl ja H₂O:a 27.7 µl.

Eksoneiden 8 ja 9 PCR tehtiin yhteisillä alukkeilla, koska ne sijaitsevat geenissä lähellä toisiaan. Niiden PCR ja reaktioseos poikkesi ensin mainitusta reaktioseoksesta ainoastaan annealing-lämpötilan, MgCl₂ ja H₂O määrän osalta. Annealing-lämpötila oli 60 astetta, MgCl₂:a 3 µl ja H₂O:a 30.7 µl.

Eksoni 12:n reaktioseos ja PCR poikkesi ensin mainitusta siten, että annealing-lämpötila oli +50 astetta, MgCl₂:a 4 µl ja H₂O:a 29.7 µl.

Eksoni 5:n PCR-reaktiosta ei saatu riittävästi tuotetta ja sekvensointi ei tuottanut useista yrityksistä huolimatta luettavaa sekvenssiä.

3.1.3 Puhdistus

PCR-tuotteet puhdistettiin kaupallisella kitillä (Fermentasin GeneJet PCR purification kit™).

Ensin PCR-tuotteisiin lisättiin kiinnityspuskuria suhteessa 1:1, sitten seos pipetoitiin puhdistuspylvääseen. Kiinnityspuskurin tarkoitus on denaturoida seoksen proteiinit, mikä auttaa DNA:n kiinnittymistä puhdistuspylvään kvartsikalvoon. Seuraavaksi puhdistuspylvästä sentrifugoitiin. Tämän jälkeen pylvääseen lisättiin 700 µl seosta johon kuuluu etanolilla laimennettua pesupuskuria. Seuraavaksi taas sentrifugointi. Lopuksi pylvääseen lisättiin vielä 50 µl liuotuspuskuria ja taas sentrifugoitiin. Jäljelle jäi 50 µl puhdistettua PCR-tuotetta.

3.1.4 Sekvensointi ja saostus

Sekvensoinnissa tarkoituksena on määrittää halutun DNA- tai RNA-molekyylin emäsjärjestys.

Sekvensointimenetelmiä on useita erilaisia. Tässä tutkimuksessa käytettiin Sangerin menetelmään perustuvaa, PCR-tekniikkaa apuna käyttävää, menetelmää. Siinä DNA avataan yksijuosteiseksi kuumentamalla. Aukaistuun DNA:han liitetään alukkeet, joiden jatkeeksi DNA polymeraasi liittää tavallisia nukleotideja, sekä muunneltuja nukleotideja, dideoksinukleotideja. Muunnellut nukleotidit pysäyttävät DNA:n kahdentumisen. Tällöin kahdentuminen katkeaa tietyn (muunnellun) nukleotidin kohdalta (A,G,T tai C). Vaikka koeputki sisältäisikin muunneltuja nukleotideja, siihen voi liittyä myös normaali nukleotidi. Se mahdollistaa eripituisten sekvenssien syntyminen. Saostuksen tarkoituksena on poistaa ylimääräiset reaktioseoksessa olevat molekyylit emäsjärjestyksen määrittystä varten. Eripituiset sekvenssit erotellaan geelielektroforeesilla ja niiden perusteella muodostetaan käsitys sekvenssin emäsjärjestyksestä.

Tässä tutkimuksessa käytettiin seuraavanlaista reaktioseosta sekvensointia varten: BigDye™ terminaattorimix 4 µl, 1.6 µM Aluke (left tai right) 1 µl, dH₂O 3 µl ja puhdistettua PCR-tuotetta 2 µl. Yhteensä 10 µl:n reaktioseos, joka ajettiin seuraavanlaisella PCR-ohjelmalla: alkudenaturaatio +95-asteessa 1 minuutin ajan, sitten 25 kertaa peräkkäin ensin +95-asteessa 30 sekuntia, sitten +55-asteessa 20 sekunnin ajan ja +60-asteessa 4 minuuttia. Loppuun vielä 4 minuutin ajan +60-asteessa. Tämän jälkeen säilyty +4-asteessa saostusta varten.

Saostus suoritettiin seuraavalla tavalla: 10 µl sekvensointituotetta sisältäviin putkiin lisättiin 25 µl 96-prosenttista etanolia ja 1 µl 3M Natriumasettaattia. Seuraavaksi yhteensä 36 µl:n seokset sekoitettiin,

inkuboitiin 10 minuutin ajan huoneenlämmössä ja siirrettiin 500 µl:n putkiin. Tämän jälkeen putket pöytäsentrifuugiin 20 minuutin ajaksi, jonka jälkeen poistettiin supernatantti. Putkiin lisättiin 125 µl 70-prosenttista etanolia; perään sentrifugointi 2 minuutin ajan. Taas poistettiin supernatantti. Putket jätettiin korkit auki kuivumaan kunnes putkista nestejäämät olivat haihtuneet. Seuraavaksi putkiin lisättiin 15 µl HiDi-formamidia ja sekoitettiin ne vortexilla. Putket vielä 2 minuutin ajaksi +95-asteeseen. Perään sekoitus vortexilla ja seosten siirto 96-levyille sekvensointikonetta varten. Lopuksi vielä 2 minuutin ajaksi +95-asteeseen, jonka jälkeen 96-levyt kuljetettiin jäiden päällä sekvensointikoneelle.

3.1.5 Sekvenssien tulkinta

Sekvenssiedostot avattiin ABI:n Sequence Scanner™ Software v1.0- tietokoneohjelmalla. Ohjelman avulla saatuja sekvenssejä pystyttiin selventämään tarkempaa analyysiä varten. Tarkempi analyysi eli tässä tapauksessa sekvenssien vertailu ja poikkeavuuksien etsiminen suoritettiin DNASTAR™:in Lasergene SeqMan -ohjelmistolla.

3.2 Eettiset näkökulmat

Tutkimukselle on myönnetty eettisen toimikunnan lupa, R04058. Tutkimuksessa ei aiheutettu osallistuneille vähäistä suurempaa haittaa. Tutkimuskäynnit suoritettiin poliklinikkakäynnin yhteydessä. Potilaiden annettua suostumuksensa tutkimukseen, verinäyte otettiin tavallisimmin saman käynnin yhteydessä. Tutkimukseen osallistuminen ei vaikuttanut potilaiden saamaan normaaliin hoitoon, eikä tutkimusasetelmaan liittynyt erityisiä eettisiä ongelmia. Tutkimuspotilaiden DNA-näytteistä tutkittiin heidän sairastamansa kliinisen taudin taustalla olevia geneettisiä muutoksia.

4 TULOKSET

Tutkimuksessa potilaiden verinäytteistä eristetystä DNA:sta sekvensoitiin lamiini A/C -geenin yhtä lukuun ottamatta kaikki eksonit (yhteensä 12 eksonia). Eksonin 5 sekvensointireaktiota ei saatu laboratorio-olosuhteissa toimimaan, joten sekvenssidataa ei siltä osin saatu. Muiden eksonien kohdalla sekvenssidataa saatiin seuraavasti: eksonit 1-4 sekä eksonit 6-10 saatiin sekvensoitua kaikkien kahdenkymmenen (20/20) näytteen kohdalla. Eksonista 11 saatiin sekvenssidataa yhdeksästätoista (19/20) tutkimusnäytteestä ja eksonin 12 kohdalla sekvensointidataa saatiin kuudestatoista (16/20) tutkimusnäytteestä.

Eksonista 1-4, 6, 9, 11 ja 12 ei sekvenssianalyysien perusteella löytynyt yhtään geenivirhettä tutkimuspopulaatiosta. Sen sijaan eksonista 7, 8 ja 10 löytyi yhden emäksen monimuotoisuutta eli SNP:tä (engl. *single nucleotide polymorphism*) (Taulukko 2.).

Eksonista seitsemän SNP todettiin emäksen 1338 kohdalla kahdesta potilasnäytteestä. Yleisin genotyyppi eli nk. villityyppi tässä kohtaa on tyymiini (T). Kahdessa havaitussa tapauksessa oli kysymyksessä heterotsygoottinen mutaatio, jossa tutkimuspotilaan toisessa alleelissa tyymiini on korvautunut sytosiinilla (C).

Eksonit 8 ja 9 sekvensoitiin yhdessä, jolloin niiden välissä oleva intronialue sisältyi saatuun sekvenssidataan. Tiedetään, että intronin alussa ja lopussa sijaitsee silmukointikohdat, joiden avulla samasta geenistä tuotetaan translaatiossa erilaisia aminohappoketjuja. Tuloksissa todettiin emäspolymorfismia juuri sekvensointidataan sisältyneen intronin alueella. SNP löytyi neljäkymmentäyksi emästä ennen eksonin 9 alkamiskohtaa. Kahdessa potilasnäytteessä havaittiin heterotsygoottinen emäsmuutos sytosiinista tyymiiniksi kyseissä kohdassa. Kyseessä oli kaksi samaa tutkimuspotilasta, joiden näytteistä löytyi emäspolymorfismia myös eksonista 7.

Eksonista 10 löytyi emäspolymorfismia kuuden tutkimuspotilaan näytteestä; kaikilta samasta kohtaa eksonin viimeisestä emäksestä. Viidellä tutkimuspotilaalla kyse oli heterotsygoottisesta monimuotoisuudesta, jossa sytosiini on korvautunut tyymiinillä emäsparin 1698 kohdalla. Lisäksi yhdellä tutkimuspotilaalla kyse oli vastaavasta homotsygoottista mutaatiosta. Yhdellä heterotsygoottin SNP:n omaavista löytyi myös edellä mainitut eksonin 7 ja intronin 8 SNP:t.

Taulukko 2. LMNA -geenin sekvensoinnissa löydetyt emäsvaihdokset.

Geenivirheen sijainti LMNA-geenissä	Geenivirhe	Kliininen merkitys	Lukumäärä n, yht. n=20
Eksoni 7	c. 1338 t->c, ei aminohappovaihdosta	ei	2
Introni 8	c. 1489-41 c->t	mahdollinen DCM riskitekijä (42).	2
Eksoni 10	c. 1698 c->t, ei aminohappovaihdosta	ei	6

5 POHDINTA

Merkittävä osa, jopa puolet, idiopaattisista DCM-tapauksista on perinnöllisiä sydänsairauksia, joiden taustalta voi olla löydettävissä geenivirheitä. Kliinisessä työssä taudin aiheuttava geenivirhe on vain harvoin tiedossa, eikä tällä hetkellä käytössä ole rutiininomaista geneettistä testiä potilaiden tutkimiseen. Mikäli kardiomyopatiaan sairastuneelta potilaalta ei löydetä taudinaiheuttajageenivirhettä, ei myöskään sukulaisten testaaminen sairastumisalttiuden tutkimiseksi ole mahdollista. Perinnöllisen DCM:n tunnettujen mutaatioiden kirjo on laaja, mikä vaikeuttaa taustalla olevan geenivirheen löytämistä. Toisaalta jopa samaa geenivirhettä kantavilla sukulaisilla sairastumisalttius ja taudin vakavuus voivat vaihdella hyvinkin paljon (4). Geenitietoa kertyy jatkuvasti lisää ja geenidiagnostiikkaa tarjoavat nykyään myös useat kaupalliset yritykset. Kuitenkaan käytännön potilastyössä ei koko genomin laajuisia geenivirheiden seulontoja ole rutiininomaisesti järkevää käyttää. Tässä tutkimuksessa keskityttiin LMNA-geeniin, joka on tähänastisten tutkimusten valossa potentiaalinen kandidaattigeeni perinnöllisen tautimuodon taustalla (7). LMNA-geenivirheitä on löydetty myös suomalaisessa potilasaineistossa (8).

Sairaanhoitopiirimme alueella on aikaisemmin käytetty *LMNA* -geenitestausta (Ser143Pro mutaatio) valikoiduissa yksittäistapauksissa osana kliinistä diagnostiikkaa. Aikaisemmassa tutkimuksessa (10) selvitimme tämän mutaation esiintyvyyttä DCM -potilaiden kohortissa. Laajemman *LMNA* -geenin tutkimuksen hyödyllisyydestä ei ole aikaisempaa tutkimusta alueellamme.

Löytämämme SNP:t eksoneista 7 ja 10 eivät aiheuta aminohapon vaihtumista, jolloin niillä ei todennäköisesti ole vaikutusta yksilön fenotyyppiin. Kyseisten SNP:ien yleisyys molempien osalta väestössä on n. 21 % (45,46). Eksonien 8 ja 9 sekvensseissä havaitulla SNP:illä sen sijaan saattaa olla merkitystä potilaiden fenotyyppiin. Kiinalaisessa tutkimuksessa on havaittu kyseisen polymorfismin olevan itsenäinen riskitekijä DCM:lle (OR=3,178). Tutkimuksessa verrattiin lamiini A/C -geenin osalta FDC:tä ja IDC:tä sairastavien ryhmää normaaleihin kontrollipotilaista koottuun ryhmään (47). SNP:n yleisyys on väestössä n. 15 % (48). Näilläkin potilailla *LMNA*-geenimuutos selittää todennäköisesti vain osan yksilöllisestä sairastumisalttiudesta. Vielä suurelta osin tuntemattomat ympäristötekijät sekä muut hankitut riskitekijät muokkaavat näiden geneettisten tekijöiden vaikutusta.

Suurella osalla *LMNA*:n geenivirheen omaavista potilaista tiedetään sydämen johtoratajärjestelmän häiriön olevan yksi taudin ensimmäisistä merkeistä (13,15,16). Muita näille potilaille tyypillisiä piirteitä ovat hidas eteisvärinä, pysyvä tahdistimen tarve, huonosti supistuva vain hieman dilatoitunut vasen kammio ja suurentunut sydänperäisen äkkikuoleman riski (5). Kuitenkaan ei ole tiedossa yksittäistä kliinisessä tutkimuksessa havaittavaa merkkiä tai tekijää, kuten laboratoriokoetta, kuvantamistutkimusta, jonka avulla voitaisiin tunnistaa *LMNA* -geenivirheen omaavat potilaat ja siten suurentunut sydänäkkikuoleman riski.

Aikaisemmassa suomalaisessa tutkimuksessa *LMNA*:n Ser143Pro mutaatio selitti n. 28 %:a familiaalisista tapauksista (8). Dilatoiva kardiomyopatia on maassamme yleisin sydämensiirtoon johtanut sydänsairaus (15) ja myös tässä potilasryhmässä *LMNA* on suomalaisessa tutkimuksessa todettu yleisimmäksi yksittäiseksi tautigeeniksi (9). Omassa tutkimuksessa kyseistä mutaatiota ei löydetty yhdeltäkään tutkimusaineiston potilaista. Yksi syy siihen, että *LMNA*:sta ei löytynyt kliinisesti merkittäviä geenivirheitä tässä tutkimuksessa voi löytyä potilasvalinnasta. Tyypillisesti *LMNA*:n geenivirheitä johtuvassa tautimuodossa on edellä mainittuja piirteitä kuten mm. johtoratajärjestelmän häiriö. Toisaalta tutkimuksemme vahvuutena voidaan pitää kaikkien tiedossa olevien positiivisen sukuanamneesin omaavien potilaiden sisällyttämistä *LMNA* -geenivirheiden seulontaan. Huomioiden FDC:n monimuotoinen geneettinen tausta ja myös potilaiden kliinisen taudinkuvan ja sydänlihassairauden fenotyypin laaja vaihtelu, halusimme laajentaa tutkimukseen otettavien potilaiden joukkoa. Tämän tutkimuksen tarkoituksena oli myös toimia pilottitutkimuksena ajatellen kaikkien uusien DCM-potilaiden lamiini A/C-geenin seulontaa.

Tutkimuksessa voidaan katsoa olevan useita heikkouksia. Tutkimuksen potilaiden valintakriteerinä oli ainoastaan vähintään yhdellä potilaan lähisukulaisella todettu DCM, mikä ei aivan täytä yleisesti

hyväksytyä familiaalisuuden määritelmää. Joidenkin kardiomyopatiapoliklinikan potilaiden kohdalla tiedot sukulaisten sairauksista jäivät puutteellisiksi, joten on mahdollista, että aineistomme ulkopuolelle on jäänyt suvuittain esiintyviä tautitapauksia. Lisäksi potilaat valittiin TAYS Sydänkeskuksen ns.

kardiomyopatiapoliklinikan potilasmateriaalista, joka voi aiheuttaa valikoitumista. Osa alueen DCM - potilaista on voitu hoitaa ilman yliopistosairaalan kardiologin konsultaatiota, eivätkä nämä potilaat siten olisi tulleet sisäänotetuiksi tutkimukseemme. Erityisesti lieväoireisia ja iäkkäämpiä potilaita on voitu hoitaa erikoistuneen poliklinikan ulkopuolella.

Johtopäätöksenä voidaan todeta, että PSHP:n alueen familiaalista DCM:aa sairastavien potilaiden joukosta ei löytynyt merkittävässä määrin *LMNA*-geenivirheitä. Ainoastaan kahdella potilaalla 20:stä todettiin muutos, molemmilla sama yksittäinen SNP, jonka on yhdessä aikaisemmassa julkaistussa tutkimuksessa todettu assosioituvan dilatoivaan kardiomyopatiaan. Ainakaan tutkitussa kaikkien familiaalisten tautitapausten populaatiossa ei *LMNA*:n geneettinen testaus näyttäisi olevan tuloksekasta. Kuitenkin valikoiduilla potilailla, erityisesti jos samanaikaisesti sydänlihassairauden kanssa todetaan edellisessä kappaleessa mainittuja kliinisiä piirteitä, tulee edelleen epäillä *LMNA* -geenivirhettä familiaalisen tautimuodon taustalla. Näidenkin potilaiden kohdalla tulee yksilökohtaisesti arvioida geneettisen taustan selvittämisestä saatavaa hyötyä. Testauksen tulosten mahdolliset vaikutukset sekä indeksipotilaan että sukulaisten tilanteeseen tulee selvittää ennen testausta. Mikäli geenivirhe todetaan, tulee potilaita hoitavalla yksiköllä olla selvä toimintamalli perinnöllisyysneuvonnan suhteen.

LÄHDELUETTELO

1. Elliott P, Andersson B, Arbustini E ym. Classification of the cardiomyopathies: a position statement from the European Society Of Cardiology Working Group on myocardial and pericardial diseases. *Eur Heart J.* 2008;29(2):270-6.
2. Jefferies JL, Towbin JA. Dilated cardiomyopathy. *Lancet* 2010;375:752-62.
3. Taylor MR, Carniel E, Mestroni L. Cardiomyopathy, familial dilated. *Orphanet J Rare Dis.* 2006;1:27.
4. Hershberger RE, Siegfried JD. Update 2011: clinical and genetic issues in familial dilated cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol.* 2011;57(16):1641-9.
5. Kärkkäinen S, Peuhkurinen K. Genetics of dilated cardiomyopathy. *Ann Med.* 2007;39(2):91-107.
6. Dittmer TA, Misteli T. The lamin protein family. *Genome Biol.* 2011;12(5):222.

7. Malhotra R, Mason PK. Lamin A/C deficiency as a cause of familial dilated cardiomyopathy. *Curr Opin Cardiol.* 2009;24(3):203-8.
8. Kärkkäinen S, Heliö T, Miettinen R. ym. A novel mutation, Ser143Pro, in the lamin A/C gene is common in Finnish patients with familial dilated cardiomyopathy. *Eur Heart J.* 2004;25:885-93.
9. Kärkkäinen S, Reissel E, Heliö T, et al. Novel mutations in the lamin A/C gene in heart transplant recipients with end-stage dilated cardiomyopathy. *Heart* 2006;92:524-6.
10. Joensuu I. Dilatoivan kardiomyopatian geneettisyys PSHP:n sydänkeskuksessa. TamPub, Tampereen Yliopiston julkaisuarkisto, 2011.
11. Baig MK, Goldman JH, Caforio ALP ym. Familial dilated cardiomyopathy: cardiac abnormalities are common in asymptomatic relatives and may represent early disease. *J Am Coll Cardiol* 1998;31:195–201.
12. Gregori D, Rocco C, Miocic S, Mestroni L. Estimating the frequency of familial dilated cardiomyopathy in the presence of misclassification errors. *J Appl Stat.* 2001;28:53-62.
13. Grünig E, Tasman JA, Kücherer H ym. Frequency and phenotypes of familial dilated cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol.* 1998;31(1):186-94.
14. Michels VV, Moll PP, Miller FA ym. The frequency of familial dilated cardiomyopathy in a series of patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *N Engl J Med.* 1992;326(2):77-82.
15. Heliö T, Peuhkurinen K. Laajentava kardiomyopatia. Kirjassa: Heikkilä J, Kupari M, toim. *Kardiologia.* 2., uudistettu painos. Helsinki: Kustannus oy Duodecim;2008, s. 864-79.
16. Report of the 1995 World Health Organization/International Society and Federation of Cardiology Task Force on the definition and classification of cardiomyopathies. *Circulation* 1996;93:841–2.
17. *Eur Heart J.* 2008 Jan;29(2):270-6. Classification of the cardiomyopathies: a position statement from the European Society Of Cardiology Working Group on Myocardial and Pericardial Diseases. Elliott P1, Andersson B, Arbustini E, Bilinska Z, Cecchi F,
18. *Circulation.* 2006 Apr 11;113(14):1807-16. Contemporary definitions and classification of the cardiomyopathies: an American Heart Association Scientific Statement from the Council on Clinical Cardiology, Heart Failure and Transplantation Committee; Quality of Care and Outcomes Research and Functional Genomics and Translational Biology Interdisciplinary Working Groups; and Council on Epidemiology and Prevention. Maron BJ, Towbin JA, Thiene G, Antzelevitch C,
19. *J Am Coll Cardiol.* 2013 Dec 3;62(22):2073-4. Classification of cardiomyopathies: evolution or revolution? Elliott PM.
20. Arimura T, Hayashi T, Kimura A. Molecular etiology of idiopathic cardiomyopathy. *Acta Myol.* 2007;26(3):153-8.
21. Ahmad F, Seidman JG, Seidman CE. The genetic basis for cardiac remodeling. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2005;6:185-216.
22. Robinson P, Griffiths PJ, Watkins H, Redwood CS. Dilated and hypertrophic cardiomyopathy mutations in troponin and alpha-tropomyosin have opposing effects on the calcium affinity of cardiac thin filaments. *Circ Res.* 2007;101(12):1266-73.
23. Parnaik VK. Role of nuclear lamins in nuclear organization, cellular signaling, and inherited diseases. *Int Rev Cell Mol Biol.* 2008;266:157-206.

24. Parks SB, Kushner JD, Nauman D ym. Lamin A/C mutation analysis in a cohort of 324 unrelated patients with idiopathic or familial dilated cardiomyopathy. *Am Heart J*. 2008;156(1):161-9.
25. Wilde AA. Channelopathies in children and adults. *Pacing Clin Electrophysiol*. 2008;31:41-45.
26. Lehnart SE, Ackerman MJ, Benson DW Jr ym. Inherited arrhythmias: a National Heart, Lung, and Blood Institute and Office of Rare Diseases workshop consensus report about the diagnosis, phenotyping, molecular mechanisms, and therapeutic approaches for primary cardiomyopathies of gene mutations affecting ion channel function. *Circulation*. 2007;116(20):2325-45.
27. Maisel A, Mueller C, Adams K Jr ym. State of the art: using natriuretic peptide levels in clinical practice. *Eur J Heart Fail*. 2008;10(9):824-39.
28. Moss AJ, Zareba W, Hall WJ ym. Prophylactic implantation of a defibrillator in patients with myocardial infarction and reduced ejection fraction. *N Engl J Med*. 2002;346(12):877-83.
29. Bardy GH, Lee KL, Mark DB ym. Amiodarone or an implantable cardioverter-defibrillator for congestive heart failure. *N Engl J Med*. 2005;352(3):225-37
30. *Ther Adv Cardiovasc Dis*. 2014 Nov 18. pii: 1753944714559935. [Epub ahead of print]
Outcome of prolonged QRS interval in dilated cardiomyopathy: role of implantable cardioverter-defibrillators on mortality.
Shuaib W1, Shahid H2, Khan MS3, Alweis R2, Sanchez LR4.
31. *Neth Heart J*. 2014 Oct;22(10):431-7. doi: 10.1007/s12471-014-0595-z.
Follow-up of implantable cardioverter-defibrillator therapy: comparison of coronary artery disease and dilated cardiomyopathy.
Verhagen MP1, van Boven N, Ruiter JH, Kimman GJ, Tahapary GJ, Umans VA.y.
32. Schächinger V, Erbs S, Elsässer A ym. Improved clinical outcome after intracoronary administration of bone-marrow-derived progenitor cells in acute myocardial infarction: final 1-year results of the REPAIR-AMI trial. *Eur Heart J*. 2006;27(23):2775-83
33. Capell B, Collins FS. Human laminopathies: nuclei gone genetically awry. *Nat Rev Genet*. 2006;7(12):940-52.
34. Coffinier C, Chang SY, Nobumori C ym. Abnormal development of the cerebral cortex and cerebellum in the setting of lamin B2 deficiency. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(11):5076-81.
35. Sylvius N, Tesson F. Lamin A/C and cardiac diseases. *Curr Opin Cardiol*. 2006;21(3):159-65.
36. Worman HJ, Bonne G. "Laminopathies": a wide spectrum of human diseases. *Exp Cell Res*. 2007;313(10):2121-33.
37. Bonne G, Mercuri E, Muchir A ym. Clinical and molecular genetic spectrum of autosomal dominant Emery-Dreifuss muscular dystrophy due to mutations of the lamin A/C gene. *Ann Neurol*. 2000;48:170-180.
38. van Berlo JH, de Voogt WG, van der Kooij AJ ym. Meta-analysis of clinical characteristics of 299 carriers of LMNA gene mutations: do lamin A/C mutations portend a high risk of sudden death? *J Mol Med (Berl)*. 2005;83(1):79-83.

39. Sylvius N, Hathaway A, Boudreau E ym. Specific contribution of lamin A and lamin C in the development of laminopathies. *Exp Cell Res.* 2008;314(13):2362-75.
40. Meune C, Van Berlo JH, Anselme F ym. Primary prevention of sudden death in patients with lamin A/C gene mutations. *N Engl J Med.* 2006;354(2):209-10.
41. Bécane HM, Bonne G, Varnous S ym. High incidence of sudden death with conduction system and myocardial disease due to lamins A and C gene mutation. *Pacing Clin Electrophysiol.* 2000;23:1661-6.
42. Parks SB, Kushner JD, Nauman D ym. Lamin A/C mutation analysis in a cohort of 324 unrelated patients with idiopathic or familial dilated cardiomyopathy. *Am Heart J.* 2008;156(1):161-9.
43. Perrot A, Hussein S, Ruppert V ym. Identification of mutational hot spots in LMNA encoding lamin A/C in patients with familial dilated cardiomyopathy. *Basic Res Cardiol.* 2009;104(1):90-9.
44. Lahiri DK, Nurnberger JI Jr. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Res.* 1991;19(19):5444.
45. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=505058
46. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=4641
47. Sun S, Zhang Y, Zhao J ym. Association between LMNA mutation and familial and idiopathic dilated cardiomyopathy patients in Xinjiang. *Chung-Hua Hsin Hsueh Kuan Ping Tsa Chih.* 2014;42(3):202-7, 2014. [Kiinalainen kardiologinen julkaisu, josta saatavissa englannin kielellä vain abstrakti.]
48. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=553016