

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

DISSERTATION

**Mutationen und Polymorphismen
im β -MHC- und Troponin T-Gen
bei Patienten mit dilatativer
Kardiomyopathie**

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Charité –
Universitätsmedizin Berlin

von
Steffen Dähmlow
aus Ulm

Gutachter: 1. Prof. Dr. V. Regitz-Zagrosek
2. Prof. Dr. M. Stoll
3. Priv.-Doz. Dr. E. Schulze-Bahr

Datum der Promotion: 07.04.2006

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Definition der Kardiomyopathien.....	1
1.2	Epidemiologie der DCM.....	1
1.3	Pathophysiologie der DCM.....	2
1.4	Klinik und Diagnostik der DCM.....	2
1.5	Therapie der DCM.....	3
1.6	Genetik der DCM.....	3
1.6.1	Zytoskelett, Intermediärfilament und Kernmembran.....	5
1.6.2	Sarkomer.....	6
1.6.3	Sarkomer-assoziiertes Protein und Z-Scheibe.....	11
1.6.4	Ionenkanäle.....	12
1.6.5	Einzelne Gene.....	12
1.7	Zielsetzung der Arbeit.....	14
2	Material und Methoden.....	15
2.1	Patientenkollektiv.....	15
2.2	Material.....	16
2.2.1	Geräte.....	16
2.2.2	Chemikalien.....	17
2.3	Methoden.....	18
2.3.1	Experimentelle Strategie.....	18
2.3.2	Isolierung und Aufarbeitung menschlicher DNA.....	18
2.3.3	Polymerase-Ketten-Reaktion.....	19
2.3.4	Agarosegel-Elektrophorese.....	22
2.3.5	Single-Strand-Conformation-Polymorphism-Analyse (SSCP-Analyse).....	23
2.3.6	SYBR [®] -Gold-Färbung.....	24
2.3.7	DNA-Sequenzierung.....	24
2.3.8	Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismen-Analyse (RFLP-Analyse).....	26
2.3.9	Heteroduplexanalyse.....	27

2.4	Statistik	27
2.4.1	Berechnung der Allelfrequenzen.....	27
2.4.2	Hardy-Weinberg-Gleichgewicht	27
2.4.3	Chi ² -Test und Fisher's exakter Test.....	28
3	Ergebnisse.....	29
3.1	Klinische Befunde des Patientenkollektivs	29
3.2	β-MHC.....	31
3.2.1	Missense-Mutationen.....	33
3.2.1.1	Ala223Thr (g.7799G>A).....	33
3.2.1.2	Ser642Leu (g.12164C>T)	34
3.2.1.3	STRAP-Analyse der Mutationen Ala223Thr und Ser642Leu.....	36
3.2.2	Seltene genetische Varianten mit unklarer funktioneller Relevanz	37
3.2.2.1	IVS11+23A>T (g.8914A>T).....	37
3.2.2.2	Asp376Asp (g.9666C>T).....	37
3.2.3	Polymorphismen.....	38
3.2.3.1	IVS2-25G>T (g.5688G>T).....	38
3.2.3.2	Thr63Thr (g.5909C>T)	39
3.2.3.3	Phe244Phe (g.7864C>T)	40
3.2.3.4	Asp325Asp (g.8867C>T).....	41
3.2.3.5	Gly354Gly (g.9600C>T)	42
3.2.3.6	Lys365Lys (g.9633G>A)	43
3.2.4	Statistische Auswertung der Polymorphismen im β-MHC-Gen.....	44
3.3	Troponin T.....	46
3.3.1	Polymorphismen.....	47
3.3.1.1	IVS3-11_IVS3-7dupCTTCT (g.6361_6365dupCTTCT).....	47
3.3.1.2	IVS5-50G>A (g.10553G>A)	48
3.3.1.3	Ser69Ser (g.12739G>A)	49
3.3.1.4	Ile106Ile (g.13150T>C)	50
3.3.1.5	IVS11-32C>A (g.15978C>A).....	51
3.3.1.6	IVS14-33C>T (g.18708C>T)	52
3.3.2	Statistische Auswertung der Polymorphismen im Troponin T-Gen.....	53

4	Diskussion	55
4.1	Bewertung des Patientenkollektivs und der Methoden	55
4.2	Bedeutung von seltenen genetischen Varianten und Polymorphismen	56
4.3	Genotyp-Phänotyp-Korrelation.....	59
4.4	Molekularbiologischer Krankheitsmechanismus	62
4.5	Phänotyp bei Mutationen in Sarkomerprotein-Genen	63
4.6	Mögliche funktionelle Effekte der Mutationen Ala223Thr und Ser642Leu.....	65
4.7	Bedeutung der molekulargenetischen Diagnostik von DCM	66
5	Zusammenfassung	68
6	Literaturverzeichnis.....	70
7	Anhang	I
7.1	Verzeichnis verwendeter Abkürzungen.....	I
7.2	Verzeichnis der Abbildungen	IV
7.3	Verzeichnis der Tabellen.....	V
7.4	Danksagung.....	VI
7.5	Lebenslauf	VII
7.6	Publikationen	VIII
7.7	Eidesstattliche Erklärung.....	IX

1 Einleitung

1.1 Definition der Kardiomyopathien

Der Begriff Kardiomyopathie wurde erstmals im Jahr 1957 für seltene, nicht-koronare Erkrankungen des Myokards unklarer Ätiologie gebraucht [1]. In den 1970er Jahren wurden Kardiomyopathien als primäre Herzmuskelerkrankungen unbekannter Ursache bezeichnet und 1980 von der World Health Organization (WHO) und der International Society and Federation of Cardiology Task Force (ISFC) ebenso definiert [2, 3].

1995 definierten WHO und ISFC Kardiomyopathien neu als Erkrankungen des Herzmuskels, die mit einer kardialen Funktionsstörung einhergehen. Die Einteilung der Kardiomyopathien in Gruppen wurde unter Berücksichtigung von pathophysiologischen und ätiologischen Gesichtspunkten modifiziert [4]. Es werden fünf Formen unterschieden: dilatative Kardiomyopathie (DCM), hypertrophe Kardiomyopathie (HCM), restriktive Kardiomyopathie (RCM), arrhythmogene rechtsventrikuläre Kardiomyopathie (ARVCM) und nicht klassifizierbare Kardiomyopathie (NKCM).

Ferner wurde der Begriff „spezifische Kardiomyopathien“ eingeführt, unter dem ischämische, valvuläre, hypertensive, inflammatorische, metabolische, systemerkrankungsbedingte, muskulär-dystrophische, neuromuskuläre, toxische und peripartale Kardiomyopathien zusammengefasst sind.

1.2 Epidemiologie der DCM

Etwa die Hälfte der diagnostizierten Fälle ist idiopathisch, die andere Hälfte ist auf vielfältige Ursachen zurückzuführen, z. B. eine koronare Herzkrankheit, virale Infektionen oder chronische Alkoholintoxikation [5]. Diese werden jedoch nach der neuen WHO-Definition den spezifischen Kardiomyopathien zugeordnet. Für die Diagnose einer idiopathischen DCM ist es also notwendig, andere Ursachen der Dilatation auszuschließen.

Die idiopathische DCM ist die häufigste Form der Kardiomyopathien [6]. Die jährliche Inzidenz in den westlichen Industrieländern liegt bei 6-8/100.000 Einwohner, die Prävalenz bei 36,5/100.000 Einwohner [6, 7]. In den USA sind 10.000 Todesfälle pro Jahr auf sie zurückzuführen. Sie stellt die Hauptindikation für eine Herztransplantation dar. Männer sind häufiger betroffen als Frauen [5, 6]. Die Erstdiagnose wird meist im mittleren Lebensalter gestellt, es erkranken jedoch auch Jugendliche [5, 6]. Die durchschnittliche 5-Jahres-Mortalität symptomatischer Patienten liegt bei 20 % [8, 9].

1.3 Pathophysiologie der DCM

Die DCM ist gekennzeichnet durch eine Dilatation und eingeschränkte systolische Funktion des linken oder beider Ventrikel, dabei sind die Herzwände normal dick oder verdünnt. Die endsystolischen und enddiastolischen Volumina sind erhöht. Gleichzeitig wird die kardiale Pumpfunktion durch die gestörte Kontraktion und Verkürzung des Myokards vermindert, das Herzminutenvolumen und die Ejektionsfraktion nehmen ab. Durch den Frank-Starling-Mechanismus kann der linksventrikuläre enddiastolische Druck erhöht und das Auswurfvolumen anfangs oft annähernd aufrecht erhalten werden [10]. Allerdings führt die Ventrikeldilatation zu einer Dehnung des Klappenrings mit Entwicklung einer relativen Mitral- bzw. Trikuspidalinsuffizienz.

Morphologisch kommt es durch die Schädigung der Herzmuskelfasern zur Umstrukturierung des Muskelfasergerüsts, wodurch die Diffusionsstrecke für Substanzen verlängert wird. Die Herzmuskelzellen werden schlechter mit Sauerstoff und Substraten versorgt, was einen weiteren Untergang von Muskelzellen mit anschließender Fibrosierung nach sich zieht.

1.4 Klinik und Diagnostik der DCM

Die ersten Symptome bestehen zumeist in Belastungsdyspnoe, schneller Ermüdbarkeit, Beinödemen, Palpitationen, Schwindel und Synkopen. Im weiteren Verlauf kommt es durch die eingeschränkte Pumpfunktion zur Herzinsuffizienz und zu Arrhythmien. Komplikationen sind Thromboembolien und der plötzliche Herztod infolge von ventrikulären Herzrhythmusstörungen.

Die Diagnosestellung erfolgt in der Regel durch die Echokardiographie, hier können die Dimensionen der Ventrikel, die Ejektions- und Verkürzungsfraktion zuverlässig ermittelt werden. Ein linksventrikulärer enddiastolischer Durchmesser (LVEDD) von > 55 mm, eine linksventrikuläre Ejektionsfraktion (LVEF) von < 45 % und eine Verkürzungsfraktion (VF) von < 25 % gelten als pathologisch. Die EKG-Veränderungen sind unspezifisch, häufig sind Linksschenkelblock, Vorhofflimmern, ventrikuläre Extrasystolen oder ventrikuläre Tachykardien zu beobachten.

Invasive Diagnostik erfolgt mittels einer Herzkatheter-Untersuchung. Durch eine Ventrikulographie kann die Pumpfunktion beurteilt und durch eine Koronarangiographie eine koronare Herzkrankheit ausgeschlossen werden. Außerdem ist es möglich, eine Druckmessung und eine Endomyokardbiopsie durchzuführen. Der histologische Befund

dieses Biopsats ist meist unspezifisch, häufig sind eine Faser- und Kernhypertrophie, eine Degeneration der Myozyten sowie eine interstitielle Fibrose zu beobachten. Die Abgrenzung von einer Myokarditis erfolgt histologisch anhand der Dallas-Kriterien bzw. durch immunhistochemische und molekularbiologische Befunde (World Heart Federation-Klassifikation) [11, 12].

1.5 Therapie der DCM

Die Therapie der DCM beruht auf der Behandlung der Herzinsuffizienz nach den Therapieempfehlungen der kardiologischen Gesellschaften, unter anderem der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie und der European Society of Cardiology [13, 14]. Neben diätetischen Maßnahmen mit Kochsalz- und Flüssigkeitsrestriktion, Alkoholkarenz und Nikotinverzicht steht die medikamentöse Behandlung im Vordergrund. ACE-Hemmer bzw. AT₁-Rezeptorblocker sowie β -Blocker als kardioprotektive Substanzen und Nachlastsenker bilden das Fundament. Daneben senken Diuretika die Vorlast und wirken der Wasserretention entgegen. Durch Herzglykoside werden die klinischen Symptome und die Belastbarkeit verbessert. Ferner wird bei Vorhofflimmern eine Thromboembolieprophylaxe mit Antikoagulanzen durchgeführt. Liegen ventrikuläre Herzrhythmusstörungen vor, erhalten die Patienten zusätzlich Antiarrhythmika der Klasse III wie Sotalol oder Amiodaron. Wenn dies nicht ausreicht, besteht die Indikation zur Implantation eines Cardioverter-Defibrillators (ICD). Bei konservativ nicht mehr behandelbarer DCM kommen biventrikuläre Schrittmacher oder als ultima ratio temporäre mechanische Unterstützungssysteme (Assist Devices) zur Entlastung und Regeneration des Herzmuskels oder eine Herztransplantation in Frage.

1.6 Genetik der DCM

1961 wurde erstmals von einer familiären Häufung der dilatativen Kardiomyopathie berichtet [15, 16, 17]. Seitdem wird ein Gendefekt als Krankheitsursache in Betracht gezogen. In den folgenden Jahren wurden weitere betroffene Familien beschrieben. Eine DCM wird heute als familiär bezeichnet, wenn mindestens zwei Familienmitglieder betroffen sind oder ein Verwandter ersten Grades vor dem 35. Lebensjahr einen ungeklärten plötzlichen Herztod erlitten hat [18].

Die erste systematische Untersuchung von Familienangehörigen erfolgte 1992 [19].

Michels et al. untersuchten die Familien von 59 Indexpatienten mit idiopathischer DCM. In zwölf Familien hatten 18 Verwandte ersten Grades ebenfalls die Diagnose DCM. Somit wurde bei zwölf der 59 Indexpatienten (20,3 %) eine familiäre DCM diagnostiziert. Im Jahr 1998 untersuchten Grünig et al. 970 Verwandte ersten und zweiten Grades von 445 DCM-Patienten [20]. Die Arbeitsgruppe kam zu dem Schluss, dass bis zu 35 % der idiopathischen DCM-Fälle familiär auftreten.

Vier verschiedene Erbgänge sind bekannt. Am häufigsten ist der autosomal-dominante [21], dabei tragen durchschnittlich 50 % der Nachkommen eines Betroffenen die ursächliche Mutation. Seltener wurde von einem X-chromosomalen Erbgang berichtet. Für den ebenfalls seltenen autosomal-rezessiven Erbgang wurden Störungen des Carnitin-Transports und von Enzymen der Fettsäureoxidation beschrieben [22]. Schließlich wurden sehr seltene Defekte in der Atmungskette mit mitochondrialem Erbgang beschrieben, die durch Energieverlust oder den intrazellulären Verbleib toxischer Metaboliten zu einer Schädigung der Muskelzellen führen [23, 24].

In den letzten zehn Jahren wurde durch Kopplungsanalysen und die Analyse von Kandidatengen bei Familien mit DCM eine Vielzahl von krankheitsverursachenden Genen entdeckt. Die ersten identifizierten Gene kodierten alle für Proteine des Zytoskeletts. Deshalb wurde DCM als Erkrankung des Zytoskeletts bezeichnet, bei der die Kraftübertragung vom Sarkomer, in dem Kraft erzeugt wird, auf die extrazelluläre Matrix gestört ist [25]. Durch die Entdeckung von Mutationen in zahlreichen weiteren Genen, die nicht für Proteine des Zytoskeletts kodieren, muss diese These jedoch in Frage gestellt werden. Des Weiteren gibt es fünf Genorte, für die noch kein Krankheitsgen gefunden wurde: 2q14-q22 [26], 6q12-q16 [27], 6q23 [28], 9q13-q22 [29] und 10q21-q23 [30].

Die derzeit bekannten Proteine, die für die Entwicklung einer DCM verantwortlich gemacht werden, und ihre jeweilige Lokalisation in der Herzmuskelzelle sind in Abbildung 1-1 schematisch dargestellt. Dabei sind verschiedene Zellkomponenten betroffen. Neben Zytoskelett, Intermediärfilament und Kernmembran sind auch das Sarkomer, ein Sarkomer-assoziiertes Protein, die Z-Scheibe und einzelne Ionenkanäle beteiligt. Im Folgenden werden die einzelnen krankheitsverursachenden Gene bzw. Proteine dieser Zellkomponenten näher beschrieben.

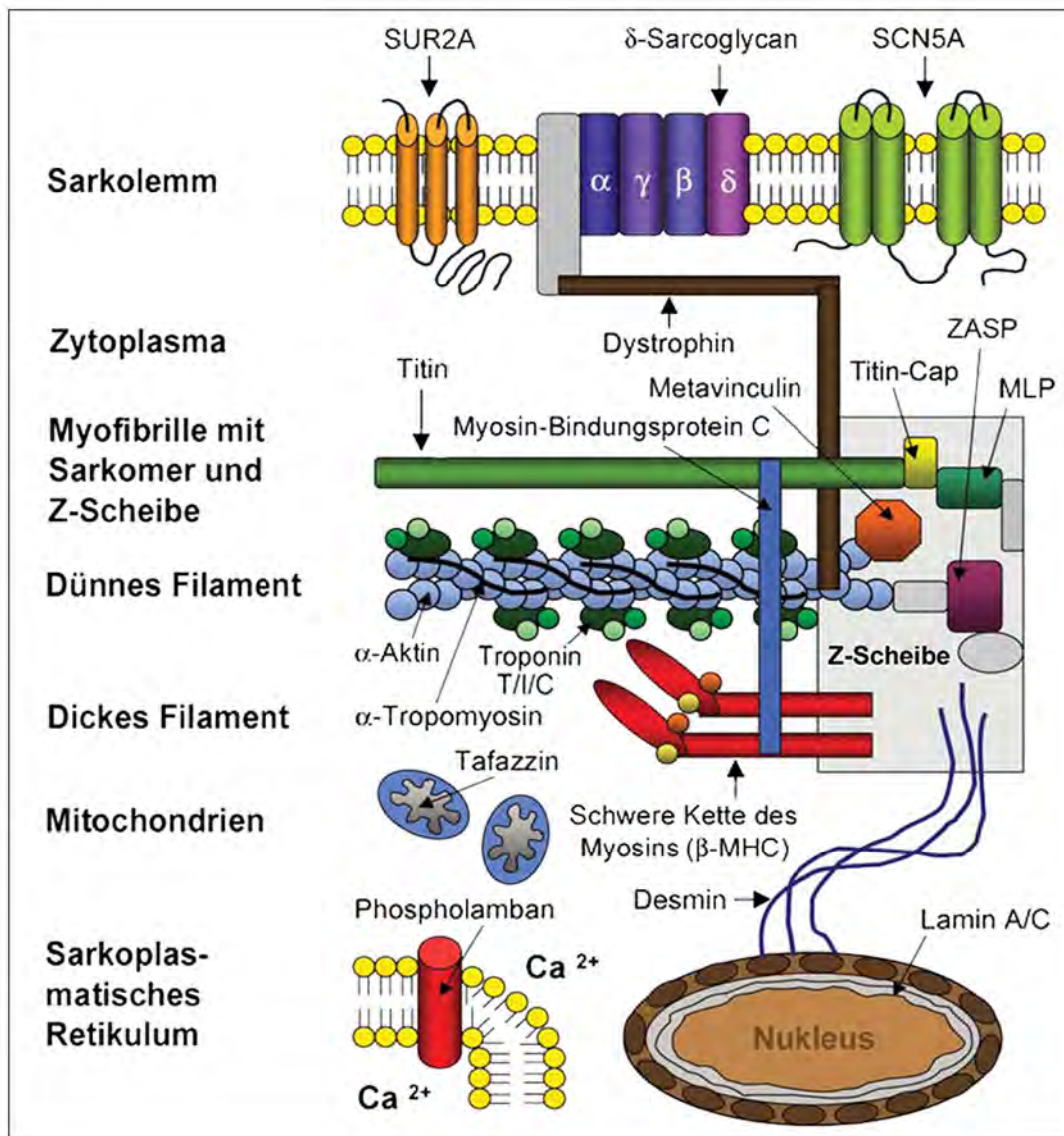


Abbildung 1-1: Schematische Darstellung der involvierten Proteine bei DCM

Betroffen sind verschiedene Zellkomponenten: Zytoskelett, Intermediärfilament, Kernmembran, Sarkomer, Sarkomer-assoziierte Proteine, Z-Scheibe, einzelne Ionenkanäle und Mitochondrien (nach Osterziel und Perrot [31]). Nicht dargestellt ist das Protein Eyes-Absent 4.

1.6.1 Zytoskelett, Intermediärfilament und Kernmembran

Mutationen im X-chromosomal-lokaliserten Dystrophin-Gen (DMD) können entweder eine reine DCM ohne Muskelbeteiligung oder die Muskeldystrophien vom Typ Duchenne und Becker, die ebenfalls häufig mit einer DCM assoziiert sind, verursachen [32, 33]. Dystrophin ist ein stäbchenförmiges Protein des Zytoskeletts an der Innenseite der Zellmembran. Mit seinem N-terminalen Teil bindet es an α -Aktin, mit dem C-terminalen an einen Glykoproteinkomplex, der die Zellmembran stabilisiert. Dieser Komplex wird auch Dystrophin-assoziiierter Glykoproteinkomplex (DAG) genannt, ein

Bestandteil davon ist δ -Sarcoglycan. Mutationen im δ -Sarcoglycan-Gen (SGCD) führen meist zur Muskeldystrophie vom Gliedergürteltyp. Tsubata et al. berichteten jedoch im Jahr 2000 von autosomal-dominant vererbten Mutationen in einer Familie mit DCM und in zwei sporadischen DCM-Fällen [34].

Li et al. fanden 1999 in einer Familie mit reiner DCM ohne Skelettmuskelbeteiligung eine Missense-Mutation im Desmin-Gen (DES) [35]. Das exprimierte Protein ist das wichtigste Intermediärfilament in Muskelzellen. Es verbindet den Zellkern über die Z-Scheiben mit der Zellmembran.

Bereits 1994 wurde für eine autosomal-dominante Form der DCM der erste Genort auf Chromosom 1 (1p1-q21) beschrieben [36]. Fatkin et al. identifizierten im Jahr 1999 an diesem Ort das Gen für das Kernmembranprotein Lamin A/C (LMNA) und berichteten von fünf Mutationen in elf Familien, die an DCM mit Erregungsbildungs- oder Erregungsleitungsstörungen erkrankt waren [37]. Mutationen im Lamin A/C-Gen können auch mit der Muskeldystrophie Emery-Dreifuss assoziiert sein, eine muskuläre Dystrophie lag bei den Familien jedoch nicht vor.

Zur These, dass DCM eine Erkrankung des Zytoskeletts sei, trugen auch zwei Mutationen im Gen für α -Aktin bei. α -Aktin zählt jedoch morphologisch zum Sarkomer und wird daher im folgenden Abschnitt besprochen [38].

1.6.2 Sarkomer

Das Sarkomer ist die kleinste funktionelle kontraktile Einheit in Muskelzellen. Es ist in dicken und dünnen Filamenten organisiert, die aufgrund ihrer regelmäßigen Anordnung für das lichtmikroskopische Erscheinungsbild, die Querstreifung der Muskulatur, verantwortlich sind. Zum dünnen Filament zählen α -Aktin, α -Tropomyosin und der Troponin-Komplex mit den Untereinheiten T, I und C. Das dicke Filament beinhaltet die schweren und leichten Myosinketten und das Myosin-Bindungsprotein C (Abb. 1-2).

Der Kontraktionsmechanismus wird durch den Anstieg des intrazellulären Calciums von ca. 10^{-8} mol/l auf ca. 10^{-5} mol/l eingeleitet. Calcium bindet an Troponin C, wodurch sich die räumliche Anordnung der Troponin-Untereinheiten ändert. Die inhibitorische Wirkung von Troponin I und α -Tropomyosin auf die Aktin-Myosin-Interaktion wird aufgehoben. α -Aktin kann an den globulären Myosinkopf binden und aktiviert die ATPase des Myosinkopfes, so dass das an Myosin gebundene ATP in ADP und Phosphat gespalten wird. Durch das Ablösen von Phosphat und ADP wird der Kopf entlang des dünnen Filaments verschoben, Aktin und Myosin gleiten aneinander vorbei.

Nach erneuter Bindung eines ATP-Moleküls wird der Aktin-Myosin-Komplex gelöst. Damit ist ein Kontraktionszyklus abgeschlossen. Die durch das Sarkomer entstandene Kraft wird anschließend durch mehrere Proteine (α -Aktin, Titin, Dystrophin und DAG) auf das Zytoskelett der Muskelzelle übertragen.

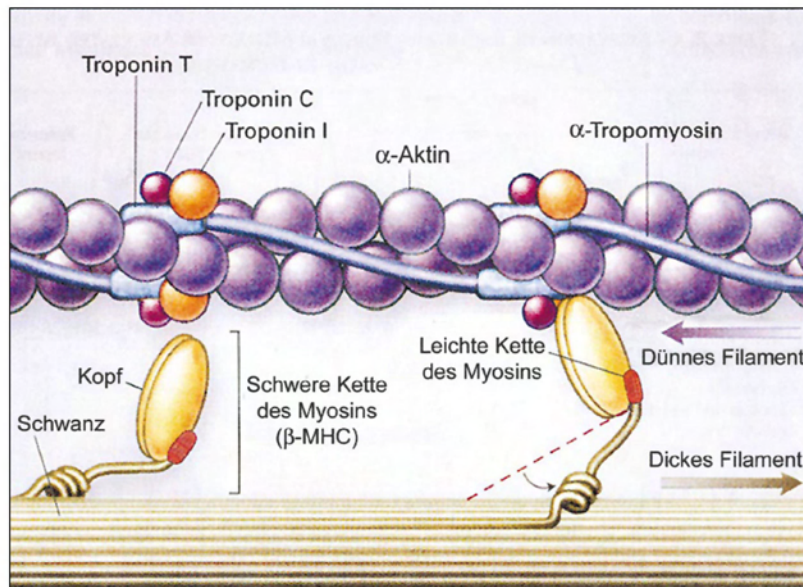


Abbildung 1-2: Schematische Darstellung des Sarkomers

Das dünne Filament besteht aus α -Aktin, dem Troponin-Komplex (Troponin T, I und C) und α -Tropomyosin. β -MHC und die leichten Ketten des Myosins bilden das dicke Filament. Die Bindung des Myosinkopfes an α -Aktin führt zur Konformationsänderung des Myosinmoleküls. Dadurch knickt der Kopf gelenkartig ab, zieht α -Aktin mit sich, und die Filamente gleiten aneinander vorbei. Dies führt zur Verkürzung des Sarkomers (nach Seidman und Seidman [39]).

Lange Zeit dachte man, dass Mutationen in Sarkomerprotein-Genen ausschließlich zu hypertropher Kardiomyopathie führen. Bisher wurden über 250 HCM-Mutationen in 13 verschiedenen Genen beschrieben, wovon neun für Sarkomerproteine kodieren [40, 41, 42, 43, 44, 45, 46]. Deshalb wurde HCM als Erkrankung des Sarkomers bezeichnet, bei der die Krafterzeugung im Sarkomer gestört ist [47].

Bereits im Jahr 1998 konnte durch eine Kandidatengen-Analyse das erste krankheitsverursachende Gen der DCM identifiziert werden. In zwei Familien wurden Mutationen im α -Aktin-Gen (ACTC) nachgewiesen [38]. α -Aktin ist ein Bestandteil des dünnen Filaments des Sarkomers und damit an der Krafterzeugung beteiligt. Es ist jedoch über Dystrophin mit Proteinen des Zytoskeletts verbunden und trägt dadurch auch zur Kraftübertragung vom Sarkomer auf die intrazelluläre Matrix bei. Da die beiden Punktmutationen zu Aminosäuresubstitutionen im Bereich der Aktin-Zytoskelett-Interaktion führen, wird nicht die Aktin-Myosin-Interaktion beeinträchtigt, die in den

Bereich des Sarkomers fällt. Durch einen Defekt in der Kraftübertragung führen diese Mutationen zur DCM. α -Aktin wurde also in diesen beiden Fällen funktionell zum Zytoskelett gerechnet, so dass die These „DCM als Erkrankung des Zytoskeletts“ bestärkt wurde [25].

Im Jahr 2000 fanden Kamisago et al. durch Kopplungsanalyse und anschließende Sequenzierung in einer Familie mit 17 betroffenen DCM-Patienten überraschend die Mutation Ser532Pro im Gen für die schwere Kette des Myosins (beta myosin heavy chain = β -MHC) [48]. Die Untersuchung von 20 weiteren Familien identifizierte die Mutation Phe764Leu in einer zweiten Familie. Die verbleibenden 19 Familien dieser zweiten Untersuchung wurden daraufhin in den Sarkomerprotein-Genen α -Tropomyosin, Troponin T und Troponin I untersucht. Zwei dieser Familien wiesen eine Deletion im Troponin T-Gen auf (Lys210del). Die Autoren schätzen, dass mindestens 10 % der familiären DCM durch Mutationen in Sarkomerprotein-Genen verursacht werden, da drei der 20 Familien, die ohne vorherige Kopplungsanalyse untersucht wurden, eine Mutation zeigten.

Die Annahme, dass Mutationen in Sarkomerprotein-Genen ausschließlich zur Hypertrophie des Herzens führen, wurde damit widerlegt. Mutationen in Sarkomerprotein-Genen können also sowohl mit DCM als auch mit HCM assoziiert sein. In der Folgezeit wurden auch in weiteren Sarkomerprotein-Genen Mutationen bei DCM identifiziert, wovon die meisten erst nach Beginn der vorliegenden Arbeit veröffentlicht wurden. Diese Gene bzw. Proteine sollen im Folgenden beschrieben werden, wobei β -MHC und Troponin T als Gegenstand der vorliegenden Dissertation ausführlich dargestellt werden:

β -MHC: Ein Myosinmolekül besteht aus zwei schweren und je zwei leichten essentiellen und regulatorischen Ketten. Eine schwere Kette wird in den globulären Kopf, eine flexible Halsregion und den filamentösen Schwanz unterteilt. Die Schwanzteile der beiden schweren Ketten sind miteinander verdrillt. Der Kopf ist zur ATP-Hydrolyse enzymatisch aktiv und enthält die Aktin-Bindungsstelle. Er wird häufig als Motor des Sarkomers bezeichnet. Man unterscheidet zwei Formen der schweren Kette: die α -Form befindet sich beim Menschen im Vorhof-, die β -Form im Kammermyokard und in langsamen Muskelfasern.

Das β -MHC-Gen (MYH7) ist auf Chromosom 14 (14q12) lokalisiert [49, 50]. Die DNA-Sequenz des Gens publizierten Jaenicke et al. im Jahr 1990 [51]. Es hat eine Länge

von 22.883 Basenpaaren und besteht aus 40 Exonen, wobei das Startkodon in Exon 3 liegt. Das gebildete Protein besteht aus 1.935 Aminosäuren.

Die erste Mutation im β -MHC-Gen fanden Geisterfer-Lowrance et al. im Jahr 1990 [52]. Betroffen war eine große kanadische an HCM erkrankte Familie, über die bereits 1961 berichtet wurde [53]. Seit 1990 wurden über 120 Mutationen im β -MHC-Gen beschrieben, die mit HCM assoziiert sind [40, 41, 42]. Bis auf wenige Ausnahmen handelte es sich dabei um Missense-Mutationen. Die überwiegende Anzahl der Mutationen ist im Kopfteil oder in der Halsregion des Proteins lokalisiert, erst in den letzten Jahren wurden zunehmend Mutationen in der Schwanz-Region beschrieben [54]. Ferner sind drei Hotspots in Kodon 403, 719 und 741 bekannt [55]. Die ersten beiden Mutationen im β -MHC-Gen, die mit DCM assoziiert sind, wurden im Jahr 2000 von Kamisago et al. entdeckt [48].

Troponin T: Dieses Protein ist die Tropomyosin-bindende Untereinheit des Troponin-Komplexes. Im menschlichen Herzmuskel kommen durch alternatives Spleißen verschiedene Troponin T-Isoformen vor. Das exprimierte Protein variiert im fetalen, adulten und kranken Herzen [56, 57]. Die genaue physiologische Relevanz dieser Isoformen ist kaum bekannt. Die hauptsächliche Form in einem gesunden adulten Herzen setzt sich aus 288 Aminosäuren zusammen. Troponin T ist ein asymmetrisches Molekül von ca. 37 kDa. Es besteht aus einem ausgedehnten N-terminalen Teil (T1: Kodon 1-187), der entlang des Tropomyosins auf dem dünnen Filament liegt, und einem globulären C-terminalen Teil (T2: Kodon 188-288), der die calciumabhängigen Bindungsstellen an α -Tropomyosin, Troponin C und I beinhaltet [58]. Die Bindungsstelle zu α -Tropomyosin befindet sich nahe dem Kodon 190. Über die Verbindung mit den anderen beiden Untereinheiten des Troponin-Komplexes und mit α -Tropomyosin reguliert es gemeinsam mit diesen die Interaktion zwischen Myosin und Aktin.

Das Troponin T-Gen (TNNT2) wurde durch Somatische-Zellhybrid-Analyse und durch Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) auf Chromosom 1q32 lokalisiert [57, 59]. Seine strukturelle Organisation und die komplette Nukleotidsequenz bei der Ratte wurden bereits 1992 von Jin et al. bestimmt [60].

Die ersten drei HCM-Mutationen wurden 1994 von Thierfelder et al. beschrieben [47]. Bis heute konnten über 20 Mutationen bei HCM identifiziert werden [40, 41, 42]. Es handelt sich dabei überwiegend um Missense-Mutationen, wobei das Kodon 92 einen Hotspot darstellt [47, 61, 62]. Außerdem wurde von zwei Deletionen und einer Spleiß-

Mutation berichtet. Damit ist Troponin T das dritthäufigste Gen mit HCM-Assoziation. Eine Troponin T-Mutation mit DCM-Assoziation wurde, wie bereits oben erwähnt, erstmals von Kamisago et al. beschrieben [48]. In zwei DCM-Familien identifizierten sie die Deletion Lys210del.

Myosin-Bindungsprotein C: Auf Chromosom 11 (11p11.2) liegt das Gen für das kardiale Myosin-Bindungsprotein C (MYBPC3) [63]. Die Funktion des Proteins ist noch nicht vollständig geklärt. Mit seinem C-terminalen Teil bindet es an Myosin und Titin. Mutationen in diesem Gen gelten als besonders häufige Ursache der HCM. Nach dem β -MHC-Gen wurden hier die meisten HCM-Mutationen identifiziert. Von den über 70 beschriebenen Mutationen führen viele zu Veränderungen von Spleißsignalsequenzen, Insertionen und Deletionen [40, 41, 42]. Bei DCM wurde bisher nur von einer Mutation bei einem Patienten berichtet. Diese wurde in Zusammenhang mit der vorliegenden Arbeit ermittelt [64].

α -Tropomyosin: Thierfelder et al. berichteten 1994 von den ersten beiden Mutationen im α -Tropomyosin-Gen (TPM1) auf Chromosom 15 (15q22.1) bei zwei Familien mit HCM [47]. Das exprimierte Protein ist ein lang gestrecktes Dimer und blockiert bei niedriger Calciumkonzentration die Wechselwirkung zwischen Myosin und Aktin. Mutationen in diesem Gen sind selten. Bisher sind elf Missense-Mutationen bei HCM beschrieben worden [40, 41, 42]. Olson et al. berichteten im Jahr 2001 von zwei Mutationen im α -Tropomyosin-Gen, die mit DCM assoziiert sind (Glu40Lys und Glu54Lys) [65].

Troponin I: Im Troponin-Komplex stellt Troponin I die inhibitorische Untereinheit dar. Die erste mit HCM assoziierte Mutation im Troponin I-Gen (TNNI3) wurde 1997 entdeckt [66]. Das Gen ist auf Chromosom 19 (19p13.4) lokalisiert. Neben über 20 Mutationen bei HCM sind auch sechs Mutationen bei RCM beschrieben [40, 41, 42]. Im Jahr 2004 wurde von Murphy et al. die erste Mutation im Troponin I-Gen bei dilatativer Kardiomyopathie beschrieben. Die Mutation Ala2Val wurde in einer Familie autosomal-rezessiv vererbt [67].

Troponin C: Auf Chromosom 3 (3p21.3-p14.3) liegt das Gen für Troponin C (TNNC1). Mutationen in diesem Gen sind sehr selten. Bisher wurde nur je eine Mutation bei einem HCM-Patienten und in einer DCM-Familie beschrieben [68, 69].

α -Aktin: Das Gen für das kardiale α -Aktin (ACTC) liegt auf Chromosom 15 (15q14). Zunächst wurden im α -Aktin-Gen die oben erwähnten DCM-Mutationen Arg312His und

Glu361Gly beschrieben [38]. Erst danach wurde in einer HCM-Familie eine Mutation entdeckt, die zu einem Aminosäureaustausch im Bereich der Aktin-Myosin-Interaktion führt [70]. Mittlerweile sind sieben HCM-assoziierte Mutationen bekannt [40, 41, 42].

Leichte Myosinketten: In den Genen für die leichten Myosinketten vom regulatorischen (MYL2) und essentiellen (MYL3) Typ auf den Chromosomen 12 (12q23-q24.3) bzw. 3 (3p21.3-p21.2) wurden erstmals von Poetter et al. Mutationen bei HCM beschrieben [71]. Die leichten Myosinketten binden im C-terminalen Bereich des Kopfteils an die schweren Ketten des Myosins und beeinflussen die Interaktion zwischen Myosin und Aktin. Mit insgesamt 14 beschriebenen Mutationen bei HCM sind Varianten in diesen beiden Genen selten [40, 41, 42]. Bei DCM wurden bisher keine Mutationen gefunden.

1.6.3 Sarkomer-assoziiertes Protein und Z-Scheibe

Die Schnittstelle zwischen Sarkomer und Zytoskelett ist die Z-Scheibe, deren Komponenten eine Schlüsselrolle in der Kraftübertragung in Muskelzellen einnehmen. Bei DCM wurden in den letzten drei Jahren neben den durch die Arbeitsgruppe Thierfelder entdeckten Mutationen im Titin-Gen (TTN) [72] auch Mutationen in den Genen für Telethonin/Titin-Cap (TCAP) [73], für die beiden LIM-Domänen-Proteine Muskel-LIM-Protein (MLP) [73] und ZASP (Z-Band alternatively spliced PDZ motif-containing protein) [74] sowie im Gen für Metavinculin (VCL) [75] beschrieben.

Titin ist das größte bekannte Protein. Es ist mit dem Sarkomer assoziiert, reicht von dessen M-Linie bis zur Z-Scheibe und liefert ein Gerüst für die Bindung der dicken und dünnen Filamente. Zusammen mit Titin-Cap und Muskel-LIM-Protein bildet es einen Komplex, der entscheidend für die Elastizität und Integrität der Myofibrillen ist [72, 73].

Das Muskel-LIM-Protein gehört zu der Familie der Cystein-reichen Proteine (CSRP). Es bindet mit seinem N-terminalen Teil an Titin-Cap, das wiederum an Titin gebunden wird [73]. LIM-Proteine haben die Fähigkeit, mit ihren LIM-Domänen Protein-Protein-Wechselwirkungen einzugehen. Dadurch können sie mehrere Proteine zu einem funktionalen Komplex zusammenführen. ZASP interagiert auf diese Weise mit der Proteinkinase C und über eine PDZ-Domäne, die ebenfalls Protein-Protein-Interaktionen vermittelt, mit dem Z-Scheibenprotein α -Aktinin [74].

Die Z-Scheiben-Komponenten Vinculin und Metavinculin verankern die Aktin-Filamente in der Z-Scheibe und übertragen so die Kontraktionskraft des Sarkomers [75].

1.6.4 Ionenkanäle

Phospholamban ist ein Transmembranprotein des sarkoplasmatischen Retikulums, das die Wiederaufnahme von Calcium-Ionen aus dem Zytoplasma in das sarkoplasmatische Retikulum reguliert. Durch Mutationen im Phospholamban-Gen (PLN) wird die Calcium-Aufnahme vermindert und so der Kontraktionszyklus gestört [76].

Das Gen ABCC9 (ATP-binding-cassette C9) kodiert für den Sulfonylharnstoff-Rezeptor 2A (SUR2A), der die regulatorische Untereinheit des kardialen ATP-abhängigen Kaliumkanals Kir6.2 bildet. Durch Öffnung ATP-abhängiger Kaliumkanäle kann das Myokard vor kardialen Stress, z. B. Hypoxie, geschützt werden. Bisher wurden zwei Mutationen bei zwei Patienten mit DCM identifiziert, die zur Dysfunktion des Kanals und dadurch zu einer verminderten Toleranz gegenüber kardialen Stress führen [77].

Im Jahr 1996 untersuchten Olson und Keating eine Familie mit DCM und supra-ventrikulären Tachyarrhythmien [78]. Durch eine Kopplungsanalyse wurde ein Locus auf Chromosom 3p22-p25 bestimmt. In dieser Familie wurde 2004 eine Mutation im Gen für SCN5A (Sodium-Channel Typ 5 α) identifiziert, das für den kardialen spannungs-abhängigen Natrium-Kanal 5 α kodiert [79]. Mutationen in diesem Gen wurden auch bei verschiedenen anderen Herzerkrankungen beschrieben, z. B. beim Long-QT- und Brugada-Syndrom [41].

1.6.5 Einzelne Gene

Das Tafazzin-Gen (TAZ) kodiert für mehrere Proteinspleißvarianten, deren Funktion nicht genau bekannt ist. Mutationen in diesem auf dem langen Arm des X-Chromosoms gelegenen Gens führen unter anderem zum Barth-Syndrom [80]. Das Syndrom ist neben DCM durch veränderte Mitochondrien, Skelettmuskelmyopathie, Wachstumsstörungen und Neutropenie gekennzeichnet. Diese infantile Form der X-chromosomalen DCM führt früh zu einer schweren Herzinsuffizienz und hat eine schlechte Prognose.

Kürzlich wurde eine Mutation in einem weiteren Gen bei einer Familie mit DCM und begleitendem sensorischen Hörverlust beschrieben, das keiner der bisher genannten Gruppen zuzuordnen ist [81]. In dieser Familie wurde eine Deletion von 4.846 bp im EYA4-Gen (Eyes absent 4) identifiziert. EYA4-Proteine sind Kotranskriptionsfaktoren, die bei der Expression von Genen beteiligt sind.

Tabelle 1-1: Bekannte Gene der dilatativen Kardiomyopathie

Gen	Genort	Protein	Erbgang	Referenz
Zytoskelett, Intermediärfilament und Kernmembran				
DMD	Xp21	Dystrophin	X	Muntoni 1993 [32]
SGCD	5q33-q34	δ-Sarcoglycan	AD	Tsubata 2000 [34]
DES	2q35	Desmin	AD	Li 1999 [35]
LMNA	1q21.2-q21.3	Lamin A/C	AD	Fatkin 1999 [37]
Sarkomer				
ACTC	15q11-q14	α-Aktin	AD	Olson 1998 [38]
MYH7	14q12	β-MHC	AD	Kamisago 2000 [48]
TNNT2	1q32	Troponin T	AD	Kamisago 2000 [48]
TPM1	15q22.1	α-Tropomyosin	AD	Olson 2001 [65]
MYBPC3	11p11.2	Myosin-Bindungsprotein C	S	Daehmlow 2002 [64]
TNNI3	19q13.4	Troponin I	AR	Murphy 2004 [67]
TNNC1	3p21.3-p14.3	Troponin C	AD	Mogensen 2004 [69]
Sarkomer-assoziiertes Protein und Z-Scheibe				
TTN	2q31	Titin	AD	Gerull 2002 [72]
TCAP	17q12	Titin-Cap / Telethonin	AD	Knöll 2002 [73]
CSRP3 / MLP	11p15.1	Muskel-LIM-Protein	AD	Knöll 2002 [73]
VCL	10q21-q23	Metavinculin	AD	Olson 2002 [75]
LDB3 / ZASP	10q22.3-q23.2	ZASP	AD	Arimura 2004 [74]
Ionenkanäle				
PLN	6q22.1	Phospholamban	AD	Schmitt 2003 [76]
ABCC9	12p12.1	Sulfonylharnstoff-Rezeptor 2A (SUR2A)	S / AD	Bienengraeber 2004 [77]
SCN5A	3p21	Natrium-Kanal 5α (SCN5A)	AD	McNair 2004 [79]
Einzelne Gene				
TAZ	Xq28	Tafazzin	X	Bione 1996 [80]
EYA4	6q23-q24	Eyes absent 4	AD	Schönberger 2005 [81]

Bisher sind 21 Gene bekannt, die mit dilatativer Kardiomyopathie assoziiert sind. Diese kodieren für Proteine verschiedener Komponenten der Herzmuskelzelle: Zytoskelett, Intermediärfilament, Kernmembran, Sarkomer, Z-Scheibe und verschiedene Ionenkanäle.

AD = autosomal-dominant, AR = autosomal-rezessiv, X = X-chromosomal, S = sporadisch.

1.7 Zielsetzung der Arbeit

Lange Zeit dachte man, dass Mutationen in Zytoskelettprotein-Genen ausschließlich zu dilatativer Kardiomyopathie und Mutationen in Sarkomerprotein-Genen ausschließlich zu hypertropher Kardiomyopathie führen. Im Jahr 2000 fand die Arbeitsgruppe Seidman überraschend auch bei DCM drei Mutationen in den Sarkomerprotein-Genen β -MHC und Troponin T. Zu Beginn der vorliegenden Dissertation im Jahr 2001 waren nur diese drei Mutationen bekannt.

Das Ziel dieser Arbeit war deshalb die Suche nach weiteren Varianten in Sarkomerprotein-Genen bei DCM. Dazu sollten Varianten in den Sarkomerprotein-Genen β -MHC und Troponin T bei 46 nicht verwandten Patienten mit idiopathischer DCM identifiziert und charakterisiert werden. Mit Hilfe der Single-Strand-Conformation-Polymorphism-Analyse (SSCP-Analyse) wurde in diesem Patientenkollektiv ein systematisches Mutationsscreening in beiden Genen angestrebt. Das β -MHC-Gen sollte im für den Kopfteil des Proteins kodierenden Bereich (Exon 3-23), in dem sich die bisher bekannten Varianten fanden, das Troponin T-Gen im gesamten kodierenden Bereich (Exon 2-16) untersucht werden. Durch die Auswahl geeigneter Primer konnten auch die jeweiligen Exon-flankierenden Intronbereiche analysiert werden, um Spleiß-Konsensus-Sequenzen zu erfassen. Gefundene Varianten sollten durch DNA-Sequenzierung charakterisiert und durch eine weitere Methode, wie die Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismen-Analyse (RFLP-Analyse) oder die Heteroduplexanalyse bestätigt werden.

Schließlich hatte die Arbeit das Ziel, die funktionelle Relevanz und mögliche Krankheitsmechanismen der gefundenen Varianten zu diskutieren. Darüber hinaus sollten die Varianten zu den in der Literatur bereits beschriebenen in Bezug gesetzt und in ihrer Häufigkeit verglichen werden.

2 Material und Methoden

2.1 Patientenkollektiv

Für diese Studie wurden 46 Patienten ausgewählt, die aufgrund einer dilatativen Kardiomyopathie im Deutschen Herzzentrum Berlin in Behandlung waren. Neben der detaillierten Anamnese und der ausführlichen körperlichen Untersuchung war die Echokardiographie Grundlage für die Diagnose der DCM. Diese umfasste die Standard-Messungen des linksventrikulären enddiastolischen Durchmessers (LVEDD), des linksventrikulären endsystolischen Durchmessers (LVESD) und der linksventrikulären Ejektionsfraktion (LVEF). Die Verkürzungsfraktion (VF) wurde mit der Formel $[(LVEDD - LVESD) / LVEDD] \times 100$ berechnet. Der LVEDD wurde entsprechend Henry et al. in bezug auf Alter und die Körperoberfläche (KO) nach der Gleichung $(LVEDD / 45,3 \times KO^{1/3} - 0,03 \times \text{Alter} - 7,2) \times 100$ korrigiert [82].

Für die Aufnahme in die Studie mussten die beiden folgenden diagnostischen Kriterien erfüllt sein:

1. eine linksventrikuläre Ejektionsfraktion unter 45 % und / oder eine Verkürzungsfraktion unter 25 %.
2. ein linksventrikulärer enddiastolischer Durchmesser über 117 % des für das Alter und die Körperoberfläche entsprechenden Normwertes.

Bei allen Patienten wurden andere Ursachen der DCM wie koronare Herzkrankheit, arterielle Hypertonie, Herzklappenerkrankungen und Myokarditis durch Untersuchungen wie Koronarangiographie und in Verdachtsfällen Endomyokardbiopsie ausgeschlossen. Auch eine hypertrophe Kardiomyopathie wurde bei allen Patienten echokardiographisch ausgeschlossen. Die 46 Patienten waren nicht miteinander verwandt.

Die in die Studie aufgenommenen Patienten wurden vor der Blutentnahme über die geplante molekulargenetische Untersuchung aufgeklärt und gaben ihr schriftliches Einverständnis zur Verwendung ihrer DNA für diese Untersuchung. Die Studie wurde von der Ethikkommission der Humboldt-Universität zu Berlin geprüft und genehmigt.

Um auszuschließen, dass die gefundenen Mutationen nur Polymorphismen sind, wurde ein Kontrollkollektiv auf das Vorhandensein dieser Mutationen untersucht. Diese Kontrollgruppe bestand aus 88 klinisch gesunden Blutspendern aus der Blutbank des Universitätsklinikums Charité der Humboldt-Universität zu Berlin.

2.2 Material

2.2.1 Geräte

<u>Autoclav:</u>	Varioclav Typ 500	H+P Labortechnik, München
<u>Cycler:</u>	GeneAmp PCR System 9600	Perkin Elmer, Weiterstadt
	Mastercycler gradient	Eppendorf, Hamburg
<u>Elektronische Pipetten:</u>	Acht-Kanal-Pipette Proline 5-100µl	Biohit, Köln
	Acht-Kanal-Pipette PreCision 0,2-10µl	Biozym, Hessisch Oldendorf
	Ein-Kanal-Pipette PreCision 20-500µl	Biozym, Hessisch Oldendorf
<u>Elektrophoresekammern:</u>	Horizon 58	Gibco BRL, Karlsruhe
	BlueMarine 200/2	Boehringer, Ingelheim
	Multigel-Long G 47	Biometra, Göttingen
<u>Fluorimager:</u>	FluorImager™ SI	Molecular Dynamics, Krefeld
<u>Geldokumentationsanlage:</u>	Transilluminator TI3	Biometra, Göttingen
	BioDoc-CCD-Camera	Biometra, Göttingen
	Bedienpult BioDoc II	Biometra, Göttingen
	Computer/Bildschirm	Biometra, Göttingen
	Video Graphic Printer UP-890 CE	Sony, Tokio
<u>Laborwaagen:</u>	Typ 1712004	Sartorius, Göttingen
	PG 5002 Delta Range	Mettler Toledo, Gießen
<u>Magnetrührer:</u>	MR 3001 K	Heidolph Instruments, Schwabach
<u>Mikrowelle:</u>	Micromat EEH 8733	AEG, Rothenburg
<u>Photometer:</u>	Lumat LB 9501	Berthold, Bad Wildbad
<u>Pipettierhilfe:</u>	Accu-Jet	Brand, Wertheim
<u>Sequenzierer:</u>	ABI Prism™ 310 Genetic Analyzer	Perkin Elmer, Weiterstadt
<u>Spannungsgeräte:</u>	Power Supply EPS 200	Amersham Pharmacia, Freiburg
	Power Supply ECPS 3000/150	Amersham Pharmacia, Freiburg
	Power Supply PS 3002	Gibco BRL, Karlsruhe
<u>Vortex:</u>	REAX 2000	Heidolph Instruments, Schwabach
<u>Wasserbad:</u>	WB 7	Memmert, Schwabach
<u>Zentrifugen:</u>	Centrifuge PMC-060	Tomy Kogyo, Tokio
	Centrifuge 5417 C	Eppendorf, Hamburg
	Biofuge Primo	Heraeus Instruments, Hanau
	Megafuge 1.0 R	Heraeus Instruments, Hanau

2.2.2 Chemikalien

DNA-Aufarbeitung:

Merck, Darmstadt:	Ammoniumchlorid, Chloroform, EDTA (Titriplex III), Kaliumhydrogencarbonat, Natriumchlorid, Natrium-Perchlorat-Monohydrat, Tris-HCl
Roth, Karlsruhe:	Ethanol, Isopropanol
Sigma, Taufkirchen:	SDS (Sodium-Dodecyl-Sulfate)

PCR:

Braun, Melsungen:	Aqua ad injectabilia
Gibco BRL, Karlsruhe:	dNTP-Set 100 mM, Magnesiumchlorid, PCR-Puffer, Taq-DNA-Polymerase (rekombinant)
InViTek, Berlin:	Primer (Tabelle 2-1 und Tabelle 2-2)
Sigma, Taufkirchen:	DMSO (Dimethylsulfoxid)

Agarosegel-Elektrophorese:

Amersham Pharmacia, Freiburg:	Ficoll 400
Biozym, Hess. Oldendorf:	BMA SeaKem LE Agarose
Gibco BRL, Karlsruhe:	100 bp-DNA-Ladder
Merck, Darmstadt:	Borsäure, Bromphenolblau, Titriplex III, Trisaminomethan
Sigma, Taufkirchen:	Ethidiumbromid

SSCP-Analyse:

Amresco, Ohio:	Acryl-40 Solution, Bis-2 Solution, Formamid
Merck, Darmstadt:	Ammoniumpersulfat
Molecular Probes, Eugene:	SYBR [®] -Gold
Roth, Karlsruhe:	TEMED (N,N,N'N'-Tetramethyldiamin)

Sequenzierung:

Amersham Pharmacia, Freiburg:	Sephadex [™] G 50 Fine
Perkin Elmer, Weiterstadt:	BigDye [™] Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit, 310 Genetic Analyzer Buffer with EDTA

RFLP-Analyse:

MBI Fermentas, St. Leon-Rot:	Hin6 I
New England BioLabs, Frankfurt:	Bsg I, Dde I, Hga I, PflM I, Taq I, TspR I

2.3 Methoden

2.3.1 Experimentelle Strategie

Die systematische Mutationssuche im β -MHC- und Troponin T-Gen umfasste 46 nicht verwandte Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie. Das Troponin T-Gen wurde im gesamten kodierenden Bereich (Exon 2-16), das β -MHC-Gen ausschließlich im für den Kopfteil des Proteins kodierenden Bereich (Exon 3-23) untersucht.

Die DNA der Patienten wurde aus Leukozyten isoliert, anschließend eine PCR durchgeführt. Die Primer waren so gewählt, dass sowohl die einzelnen Exone als auch die sie umgebenden Intronbereiche amplifiziert werden konnten. So wurden die Spleiß-Konsensus-Sequenzen zusätzlich erfasst. Im Anschluss daran erfolgte eine SSCP-Analyse der einzelnen Fragmente bei Raumtemperatur und 4° C. Nach SYBR[®]-Gold-Färbung wurden die Gele auf Laufmusterabweichungen hin untersucht.

Proben mit abweichendem Bandenmuster wurden nach der Methode von Sanger sequenziert. Als zusätzliche Bestätigung der Varianten wurde entweder eine Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismen-Analyse, eine Heteroduplexanalyse oder eine erneute Sequenzierung eines unabhängigen PCR-Produkts angewandt.

2.3.2 Isolierung und Aufarbeitung menschlicher DNA

Die genomische DNA wurde aus Leukozyten von frischem oder eingefrorenem EDTA-Blut isoliert. Die Aufarbeitung der DNA wurde nach folgendem Standardprotokoll, modifiziert nach Miller, durchgeführt [83].

1. 10 ml Blut wurden mit 30 ml Frischlysispuffer (155 mM Natrium-Perchlorat-Monohydrat + 10 mM Kaliumhydrogencarbonat + 0,1 mM EDTA) gemischt, 15 Minuten auf Eis lysiert und 10 Minuten bei 3.000 rpm und 4° C zentrifugiert.
2. Der Überstand wurde vorsichtig abgegossen, das entstandene Leukozytenpellet mit 2 ml Frischlysispuffer gespült und in 8 ml Lösung B (400 mM Tris-HCl + 60 mM EDTA + 150 mM Natriumchlorid + 1 % SDS) vollständig gelöst.
3. 2,7 ml Lösung C (3,6 M Na-Perchlorat) wurden mit dem gelösten Pellet gemischt und nach Zugabe von 8 ml Chloroform 5 Minuten bei 3.000 rpm zentrifugiert.
4. Nach Abnehmen der oberen Phase wurde die gewonnene Lösung zur Präzipitation der DNA mit 1 Volumen gekühltem Isopropanol überschichtet.

5. Im Anschluss wurde der DNA-Faden entnommen, in 70 %igem Ethanol gewaschen und in 400 µl TE-Puffer (10 mM Tris + 1 mM EDTA) gelöst.
6. Die Bestimmung der Konzentration und der Reinheit der isolierten DNA erfolgte durch photometrische Messung bei Wellenlängen von 260 nm und 280 nm.

2.3.3 Polymerase-Ketten-Reaktion

Durch die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) nach Mullis können Nukleotidsequenzen *in vitro* exponentiell vervielfältigt werden und so weiteren molekulargenetischen Methoden zugänglich gemacht werden [84]. Bei diesem zyklischen Verfahren lässt sich ein beliebiger DNA-Abschnitt von bis zu 20.000 Basenpaaren amplifizieren, wobei ca. 10^7 Kopien der DNA-Zielsequenz entstehen [85]. Man benötigt dafür zwei Oligonukleotide (Primer), die die DNA-Fragmente einrahmen und zum gegenüberliegenden Einzelstrang jeweils komplementär sind. Eine thermostabile Taq-DNA-Polymerase vervollständigt die benachbarten Einzelstränge durch Einbau von Nukleotiden (dNTPs). Aus den veröffentlichten Sequenzen des β -MHC- und Troponin T-Gens wurden die Primer mittels des Programms „Primer“ (Version 5.0) ausgewählt. Zum Zeitpunkt des Primer-Designs lag die genomische DNA über die gesamte Länge des Gens nur für das β -MHC-Gen vor (GenBank Accession Number M57965.1). Für das Troponin T-Gen waren lediglich die Sequenzen der Exone und der angrenzenden Intronbereiche bekannt (GenBank Accession Number AF004409.1 - AF004422.1).

Die Primer wurden so gewählt, dass Spleiß-Stellen mit erfasst waren und PCR-Fragmente von 150 bis 300 bp Länge als optimale Fragmentgröße für die SSCP-Analyse entstehen. Deshalb wurden die Exone 16 und 22 des β -MHC-Gens in zwei überlappenden Fragmenten und die Exone 8 und 9 im β -MHC-Gen und die Exone 3 und 4 im Troponin T-Gen jeweils in einem Fragment amplifiziert. Als weitere Optimalwerte wurden eine geringe Sekundärstrukturbildung und 3'-Selbst-Komplementarität, eine Schmelztemperatur von 57 bis 63° C, eine Primerlänge von 18 bis 23 Nukleotiden und ein GC-Gehalt von 40 bis 60 % angestrebt.

Im Troponin T-Gen wurde nicht mit allen nach der Sequenz von Gerull et al. (GenBank Accession Number AF004409.1 - AF004422.1) synthetisierten Primern ein optimales Amplifikat erzielt. Die Sequenzen für die Primer 10R, 11R, 13R und 14F wurden durch Sequenzierung von drei Fragmenten bestimmt, die durch die Amplifikation mit den Primern 13F und 14R, 11F und 12R und anschließend 10F und 11R gewonnen wurden.

Tabelle 2-1: Primerpaare für die Mutationssuche im β -MHC-Gen

Exon		Primer-Sequenz	Nukleotid- position	Fragment- länge	Annealing- Temperatur
3	F	5'-CCAGGGAGGGAAGGGAAGA-3'	5654-5672	313 bp	62° C
	R	5'-TGTACAGGTGGCCAGGGTGGGA-3'	5946-5966		
4	F	5'-AACCCCTCTTGAGGAAGGAGG-3'	6161-6180	259 bp	62° C
	R	5'-TGGATGGAGCAAGAACAGAG-3'	6400-6419		
5	F	5'-CTCTAACTCCCAAAATCACC-3'	6587-6606	268 bp	60° C
	R	5'-TATCCCAGTTCCCTTCAGGAA-3'	6834-6854		
6	F	5'-GCATCCTGTGCAGCTCCT-3'	6898-6915	226 bp	60° C
	R	5'-GGGTCAGGGTAATGGTCAGA-3'	7104-7123		
7	F	5'-GGTCTCCAGTAGTATTGTTC-3'	7533-7552	207 bp	60° C
	R	5'-TCTTCTCCCTCCCTTTCTGCG-3'	7720-7739		
8/9	F	5'-TGTACCGCAGAAGGGAGGG-3'	7715-7733	357 bp	61° C
	R	5'-GGTGAGCTTAGGCTGAGCCT-3'	8052-8071		
10	F	5'-TCTGCCTTTTGCTTGCTACA-3'	8358-8377	240 bp	60° C
	R	5'-ACCAGGTTGCCATGGAGATA-3'	8578-8597		
11	F	5'-GCTTGTGTCCCACCCTAA-3'	8752-8769	188 bp	61° C
	R	5'-CCTCACTGCCAATCCTCCC-3'	8921-8939		
12	F	5'-TACCCATCATACTTCTTTTTCTG-3'	9486-9508	226 bp	60° C
	R	5'-TGACTTGACAGCTGCCCCCA-3'	9694-9711		
13	F	5'-CCAGCAGTCATCTCTTACC-3'	10047-10066	218 bp	60° C
	R	5'-ATGCCAGTCTCCCTACCCT-3'	10246-10264		
14	F	5'-CCTGCTCAATATGGGTCTCTC-3'	10304-10324	237 bp	60° C
	R	5'-AATGTGGGAGCGAGTGAGTG-3'	10521-10540		
15	F	5'-CCACTCACACCCACTTTCTG-3'	10723-10742	259 bp	62° C
	R	5'-TGTGCAGGGAGAATTCAGGT-3'	10962-10981		
16a	F	5'-CCTGTGTGAAGGACTCAG-3'	11503-11522	216 bp	60° C
	R	5'-CGGCATAGTGGATCAGGGAG-3'	11699-11718		
16b	F	5'-TGTTTGACAACCACCTGGGC-3'	11623-11642	296 bp	62° C
	R	5'-CTGGCTCAGAACCTTGGCAGA-3'	11898-11918		
17	F	5'-CCTACCTCCCCCACTGATG-3'	12080-12099	147 bp	60° C
	R	5'-GCCAAGTTGGCTGGGGCTGTGTC-	12204-12226		
18	F	5'-CAGGGCCCTTCATCTCT-3'	12440-12457	257 bp	60° C
	R	5'-TATGCCAGCAGTGGGTT-3'	12679-12696		
19	F	5'-CTCACAGACTCCTCCTACTT-3'	13318-13337	219 bp	60° C
	R	5'-ATCCCATCCCATCAGGGCA-3'	13517-13536		
20	F	5'-CAGAGCAGATCACTGCAGAGC-3'	13564-13584	229 bp	62° C
	R	5'-GGAGTCAATGGAAAAGAGATGTC-	13770-13792		
21	F	5'-CCATCTCTTCCCTCGTACC-3'	13958-13977	245 bp	62° C
	R	5'-AACCAGCCTGGGCCTCAGAGAA-3'	14181-14202		
22a	F	5'-ACCTCAGGTAGGAAGGAGGC-3'	14353-14372	215 bp	62° C
	R	5'-CTCTTTGAGGCGTGTGAACT-3'	14548-14567		
22b	F	5'-GAAGAGTGCAGAAAGAGAGAA-3'	14504-14524	221 bp	60° C
	R	5'-GGGTCTGTGGGAAGTGAAGG-3'	14706-14724		
23	F	5'-CCTGCAAGAATGGAGGACCT-3'	15225-15243	336 bp	63° C
	R	5'-AGACCCGGGCTGGAGCCAAA-3'	15541-15560		

Die Nukleotidposition gibt die Position des Primers auf der von Jaenicke et al. [51] publizierte DNA-Sequenz des β -MHC-Gens an (GenBank Accession Number M57965.1). F = forward, R = reverse.

Tabelle 2-2: Primerpaare für die Mutationssuche im Troponin T-Gen

Exon		Primer-Sequenz	Nukleotid-position	Fragment-länge	Annealing-Temperatur
2	F	5'-TTCTGAGGAAGGCAGGCTTC-3'	120-139	143 bp	58° C
	R	5'-CCCCACTCAGGCAAGATG-3'	245-262		
3/4	F	5'-ATGTGCTGTGTGCGAGCTAC-3'	94-113	261 bp	60° C
	R	5'-GACAGATGAGCTGCTTTCCC-3'	335-354		
5	F	5'-TGGTTCTGCCTGATAGCATG-3'	31-50	236 bp	60° C
	R	5'-GTCAGGTGCACATGGGAAG-3'	248-266		
6	F	5'-CAGGGGAATGTGTGTGTGAG-3'	111-130	268 bp	60° C
	R	5'-TGTGGGATTCTCCTCCAAAG-3'	359-378		
7	F	5'-ATGGGGAAATGGAAATCCAC-3'	174-193	180 bp	62° C
	R	5'-CTCTCCTAGGCCTCTGCTCC-3'	334-353		
8	F	5'-TGCCATTGTTGACGTCAG-3'	44-61	243 bp	59° C
	R	5'-GGCCTACTCAACCCACAG-3'	269-286		
9	F	5'-GTGTCTAGCCCACCCATCTC-3'	40-59	241 bp	62° C
	R	5'-TGAGACAGACTGGCCATCAG-3'	258-277		
10	F	5'-GGAGGCCGGGCACCATTG-3'	50-67	244 bp	68° C
	R	5'-ATGGGCCTGGGCTAGGGG-3'	-		
11	F	5'-CAATCCTTTCCCCTAATTTGC-3'	97-117	227 bp	60° C
	R	5'-CTGCAGTGGACACCTCATTC-3'	-		
12	F	5'-CTCTTCCATGTCTCTCCTTGC-3'	22-42	150 bp	54° C
	R	5'-GGGGAGGAAGAAGGCTTGAG-3'	152-171		
13	F	5'-GTGGCAGTTTACTCTGCTTCC-3'	125-145	232 bp	60° C
	R	5'-TGGTGGCTCACAGCAAGAAG-3'	-		
14	F	5'-AGGGCCCTTTCTTACTGGAC-3'	-	191 bp	60° C
	R	5'-CCAGGAGGAGTGTGAGATGG-3'	186-205		
15	F	5'-TGCACTCACCCCTTCTC-3'	72-89	193 bp	60° C
	R	5'-CTGGAAGGTAGGGAAGGAGG-3'	245-264		
16	F	5'-CCATGTCACTGCGTCCTG-3'	40-57	189 bp	60° C
	R	5'-CCCCATTTCCAAACAGGAG-3'	209-228		

Die angegebene Nukleotidposition gibt die Position des Primers auf der DNA-Sequenz des Troponin T-Gens nach Gerull et al. an (Exon 2 - 16: GenBank Accession Number AF004409.1 - AF004422.1). Die Primer 10R, 11R, 13R und 14F wurden anhand eigener Sequenzierung bestimmt. F = forward, R = reverse.

Der PCR-Standardansatz mit einem Gesamtvolumen von 25 µl enthielt folgende Reagenzien:

10 x PCR-Puffer	2,5 µl
MgCl ₂ (50 mM)	0,75 µl
dNTPs (jeweils 1,25 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	4,0 µl
Taq-DNA-Polymerase (5 U/µl)	0,2 µl
Forward-Primer (10 pmol/µl)	0,5-1 µl
Reverse-Primer (10 pmol/µl)	0,5-1 µl
DNA (20 ng/µl)	1-5 µl
Aqua ad injectabilia	ad 25 µl

Die PCR-Reaktion erfolgte standardisiert nach dem in Tabelle 2-3 aufgeführten Thermoprofil in einem Thermocycler des Typs GeneAmp 9600 von Perkin Elmer.

Tabelle 2-3: Standard-Protokoll für die PCR-Reaktion

	Dauer	Temperatur	Funktion	Zyklen
I	5 Min	94° C	Initiale Denaturierung des Doppelstrangs	1
II	20 Sek	94° C	Denaturierung	35
	20 Sek	siehe Tabelle 2-1 und Tabelle 2-2	Primer-Annealing	
	20 Sek	72° C	Primer-Extension	
III	10 Min	72° C	Finaler Verlängerungsschritt	1

Für ein optimales PCR-Ergebnis wurde die Annealing-Temperatur der einzelnen Primerpaare in einem Gradientencycler systematisch variiert, die optimalen Temperaturen sind in Tabelle 2-1 und Tabelle 2-2 aufgelistet. Zur Optimierung des Fragments „Troponin T-Exon 12“ war ein Zusatz von 3 %igem DMSO notwendig. DMSO führt zu einer Unterbrechung der Wasserstoffbrückenbindungen des Doppelstranges, wodurch die anschließende Primerhybridisierung erleichtert wird. Um Kontaminationen auszuschließen, wurde stets eine Negativkontrolle (Aqua ad injectabilia statt DNA) amplifiziert.

2.3.4 Agarosegel-Elektrophorese

Zum Nachweis von Spezifität und Quantität der PCR-Produkte wurden diese auf einem Agarosegel in einer Gibco BRL Horizon 58 Elektrophoresekammer aufgetrennt. Das eingesetzte Gel war 1,14 %ig: 0,4 g Agarose, 35 ml 1-fach TBE (0,1 M Tris Base + 0,1 M Borsäure + 0,002 M Titriplex III), 2 µl Ethidiumbromid (0,7 µg/µl).

4 µl des Amplifikats wurden mit 2 µl Agaroseladepuffer (20 ml 5-fach TBE [0,5 M Tris Base, 0,5 M Borsäure, 0,01 M Titriplex III] + 40 ml Ficoll 400 (20 %) + 10 ml Bromphenolblau (0,1 %) + 30 ml Aqua destillata) versetzt und zusammen mit einem 100 bp DNA-Längenstandard aufgetragen. Die Proben wurden in einem Spannungsfeld von 120 Volt und einer Laufzeit von 20 Minuten elektrophoretisch aufgetrennt. Als Laufpuffer diente 1-fach TBE (0,1 M Tris Base + 0,1 M Borsäure + 0,002 M Titriplex III). Das mit Ethidiumbromid gefärbte Amplifikat wurde durch Fluoreszenz in ultraviolettem Licht sichtbar gemacht und mittels einer Videodokumentationsanlage der Firma Biometra dokumentiert.

2.3.5 *Single-Strand-Conformation-Polymorphism-Analyse (SSCP-Analyse)*

Die SSCP-Analyse beruht auf der Beobachtung, dass einzelsträngige DNA-Fragmente eine sequenzspezifische Konformation einnehmen und bei elektrophoretischer Auftrennung in einem nicht-denaturierenden Gel ein spezifisches Laufverhalten aufweisen. Bereits bei einem Austausch von nur einer Base ändert sich die Laufgeschwindigkeit des Einzelstrangs, da die DNA durch ihre veränderte Basensequenz eine andere Sekundärstruktur einnimmt [86, 87, 88, 89].

Der entscheidende Vorteil der SSCP-Analyse gegenüber anderen Mutationsdetektionsverfahren liegt in der schnellen, einfachen und kostengünstigen Durchführung. Einschränkend ist die Länge der Fragmente, jedoch lassen sich bei einer Fragmentlänge von 150 bis 300 bp unter Einsatz geeigneter Elektrophoresebedingungen Detektionsraten von 70 bis 90 % der Mutationen erreichen [90, 91]. Jedes PCR-Amplifikat wurde unter zwei verschiedenen Elektrophoresebedingungen aufgetrennt, um eine möglichst hohe Sensitivität zu erreichen. Die Analyse erfolgte sowohl bei Raumtemperatur und einer Spannung von 60 Volt als auch bei 4° C und 70 Volt. Die Laufzeit der Gele betrug jeweils ca. 16 Stunden.

Durchführung der SSCP-Analyse:

1. Die durch PCR gewonnenen DNA-Fragmente wurden auf 10 %igem Polyacrylamidgel aufgetrennt (Acrylamid : Bisacrylamid, 49 : 1). Durch die Zugabe von Tetramethyldiam (TEMED) wurde die Polymerisation der Gele katalysiert und durch Ammoniumpersulfat (APS) gestartet. Die verwendete Polyacrylamid-Lösung für ein Gel wurde wie folgt hergestellt:

40 %iges Acrylamid	245 ml
2 %iges Bisacrylamid	100 ml
10-fach TBE (1M Tris Base + 1 M Borsäure + 0,02 M Titriplex III)	50 ml
TEMED	1000 µl
Aqua destillata	ad 1000 ml

2. Für jedes Gel wurden 20 ml Polyacrylamid-Lösung mit 300 µl einer 10 %igen APS-Lösung gemischt und in das Glasplattensystem Multigel-Long der Firma Biometra gegossen. Nach ca. 20 Minuten war die Polymerisation der Gele abgeschlossen.

3. 8 µl des PCR-Produkts wurden mit 12 µl eines Gelladepuffers gemischt. Dieser SSCP-Ladepuffer bestand im Verhältnis 7 : 1 aus Formamid und Agaroseladepuffer (20 ml 5-fach TBE [0,5 M Tris Base, 0,5 M Borsäure, 0,01 M Titriplex III] + 40 ml Ficoll 400 (20 %) + 10 ml Bromphenolblau (0,1 %) + 30 ml Aqua destillata). Die Proben wurden 5 Minuten bei 95° C denaturiert und anschließend auf Eis gelagert, um eine Renaturierung zu verhindern. Jeweils 8 µl wurden auf die Gele aufgetragen.
4. Als Elektrophorese-Laufpuffer diente 0,5-fach TBE (0,05 M Tris Base + 0,05 M Borsäure + 0,001 M Titriplex III).

2.3.6 SYBR[®]-Gold-Färbung

Zur Visualisierung der aufgetrennten Einzelstränge aus der SSCP-Analyse wurden die Polyacrylamidgele mit SYBR[®]-Gold gefärbt. Dieses interkaliert in DNA-Fragmente und hat fluoreszierende Eigenschaften. Nach der elektrophoretischen Auftrennung der Einzelstränge wurde jedes Gel mit 3 bis 5 ml SYBR[®]-Gold-Lösung (5 µl SYBR[®]-Gold ad 50 ml Aqua destillata) gleichmäßig benetzt und 10 bis 20 Minuten inkubiert.

Das fluoreszenzgefärbte Gel wurde in einem FluorImager[™] SI System mit ultraviolettem Licht bestrahlt und dadurch zur langwelligen Sekundärstrahlung angeregt. Im FluorImager[™] SI System wurde diese Sekundärstrahlung gefiltert (530 nm), quantitativ erfasst und Punkt für Punkt zu einem Bild umgesetzt.

2.3.7 DNA-Sequenzierung

Auffällige DNA-Proben aus der SSCP-Analyse wurden in einem ABI Prism[™] 310 Kapillarsequencer nach der enzymatischen Methode von Sanger sequenziert [92].

Bei dieser Methode wird einzelsträngige DNA von einem Startpunkt aus mit Hilfe einer DNA-Polymerase durch einen komplementären Strang zum Doppelstrang ergänzt. Neben den üblicherweise verwendeten Desoxy-Nukleotidtriphosphaten (dNTP) werden auch 2',3'-Dideoxy-Nukleotidtriphosphate (ddNTP) zugegeben, die zusätzlich am 3'-Ende der Desoxyribose desoxygeniert sind, so dass die Elongation beim Einbau der ddNTP abbricht. Zusätzlich ist jedes ddNTP mit einem unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoff markiert, der ein spezifisches Emissions- und Absorptionsspektrum besitzt. Bei der Synthese der Doppelstränge entstehen auf diese Weise unterschiedlich lange DNA-Fragmente in einem Größenbereich von einem bis mehreren hundert Nukleotiden.

Nach elektrophoretischer Auftrennung der Fragmente in einer Gelkapillare werden die

unterschiedlichen, basenspezifischen Fluoreszenzfarbstoffe mittels Laser zur Sekundärstrahlung angeregt. Anhand des Fluoreszenzmusters wird die Nukleotidsequenz des DNA-Produkts durch das ABI Prism™ Sequencing System analysiert und in einem Elektropherogramm dargestellt.

Aufreinigung der PCR-Produkte:

Das zu sequenzierende PCR-Produkt wurde zuvor mit dem Invisorb Spin PCRapid Kit von InViTek nach Herstellerangaben aufgereinigt. Mit diesem Kit werden PCR-Amplifikate von Puffer, Salzen, Nukleotiden, Primern und Polymerasen gereinigt.

Durchführung der Sequenzierung:

Die Sequenzierungsreaktion wurde mit einem BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit der Firma Perkin Elmer durchgeführt und enthielt pro Ansatz:

Terminationsmix (dNTPs, ddNTPs, Ampli-Taq-DNA-Polymerase)	3 µl
Primer (1 pmol/µl)	2 µl
aufgereinigte DNA	500 ng
Aqua ad injectabilia	ad 10 µl

Die Reaktion erfolgte in einem Thermocycler GeneAmp 9600 der Firma Perkin Elmer nach folgendem Thermoprofil.

Tabelle 2-4: Standard-Protokoll für die Sequenzierungsreaktion

	Dauer	Temperatur	Funktion	Zyklen
I	60 Sek	96° C	Initiale Denaturierung des Doppelstrangs	1
II	10 Sek	96° C	Denaturierung	25
	10 Sek	50° C	Primer-Annealing	
	4 Min	60° C	Primer-Extension	
III	∞	4° C	Abkühlung	

Anschließend wurde das Produkt in einer Sephadex™ G-50 Säule gereinigt, um überschüssige ddNTPs zu entfernen, da diese durch ihre Fluoreszenzmarkierung zu einer Verfälschung des Signalbildes führen würden. In einem ABI Prism™ 310 Kapillarsequencer wurden die entstandenen Fragmente elektrophoretisch aufgetrennt, und anhand des unterschiedlichen Fluoreszenzmusters konnte nun die genaue Sequenz des DNA-Abschnitts ermittelt werden.

2.3.8 Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismen-Analyse (RFLP-Analyse)

Nach der Identifikation einer Variante in SSCP-Analyse und Sequenzierung lässt sich diese sicher und schnell durch eine RFLP-Analyse unabhängig bestätigen [93].

Grundlage dieser Methode ist die Tatsache, dass durch eine Variante eine Erkennungssequenz einer Restriktionsendonuklease neu entsteht oder zerstört wird. Restriktionsendonukleasen schneiden doppelsträngige DNA an einer bestimmten Stelle innerhalb einer spezifischen Erkennungssequenz oder in einem bestimmten Abstand zu ihr. Je nach Vorhandensein der Variante ändert sich das Schnittmuster, was zu Restriktionsfragmenten unterschiedlicher Länge führt. Die Auswahl möglicher Restriktionsenzyme erfolgte mit Hilfe der Datenbank Webcutter 2.0 [94].

Ansatz für den Restriktionsverdau:

Puffer (vom Hersteller mitgeliefert)	2 µl
Restriktionsenzym	5-10 U
PCR-Produkt	2,5-5 µl
Aqua ad injectabilia	ad 20 µl

Je nach Herstellerangaben wurden zusätzlich S-adenosylmethionin oder bovines Serumalbumin (BSA) in der entsprechenden Menge dazu gegeben. Der Reaktionsansatz wurde gemischt und bei optimaler Temperatur ca. 16 Stunden im Wasserbad inkubiert (Tab. 2-5). Die verschiedenen Restriktionsfragmente wurden über 2 Stunden bei 120 Volt auf einem 10 %igen Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und durch SYBR[®]-Gold-Färbung sichtbar gemacht. Anhand des Bandenmusters konnte der Genotyp jeder Probe bestimmt werden.

Tabelle 2-5: Restriktionsendonukleasen für die RFLP-Analyse

Gen	Exon / Intron	Restriktionsendonuklease	Erkennungssequenz und Schnittstelle	Temperatur
MYH7	Intron 2	Bsg I	5'...GTGCAG(N) ₁₆ ▼...3' 3'...CACGTC(N) ₁₄ ▲...5'	37° C
	Exon 3	Dde I	5'...C▼TNAG...3' 3'...GANT▲C...5'	37° C
	Exon 12	Hin6 I	5'...G▼CGC...3' 3'...CGC▲G...5'	37° C
TNNT2	Exon 9	Taq I	5'...T▼CGA...3' 3'...AGC▲T...5'	65° C
	Intron 14	TspR I	5'...NNCAGTGNN▼...3' 3'...▲NNGTCACNN...5'	65° C

2.3.9 Heteroduplexanalyse

Durch die Heteroduplexanalyse können kleinere Deletionen, Insertionen und Einzelbasenaustausche identifiziert werden [95, 96]. Dabei wird ein DNA-Doppelstrang durch Erhitzung in seine Einzelstränge aufgetrennt. Durch langsamen Temperaturabfall bis auf Raumtemperatur renaturieren die Einzelstränge wieder zu Doppelsträngen, hierbei entstehen bei heterozygoten Varianten Heteroduplexe, d.h. das mutierte Allel hybridisiert mit dem Wildtyp-Allel. Der neu entstandene Doppelstrang ist nicht mehr komplementär. Bei elektrophoretischer Auftrennung zeigen die Heteroduplexe aufgrund einer veränderten Sekundärstruktur ein anderes Laufverhalten.

Durchführung der Heteroduplexanalyse:

4 µl des PCR-Produkts wurden 5 Minuten bei 95° C denaturiert und anschließend langsam auf Raumtemperatur abgekühlt. Jede Probe wurde mit 5 µl Agaroseladepuffer (20 ml 5-fach TBE [0,5 M Tris Base, 0,5 M Borsäure, 0,01 M Titriplex III] + 40 ml Ficoll 400 (20 %) + 10 ml Bromphenolblau (0,1 %) + 30 ml Aqua destillata) gemischt und auf ein 10 %iges Polyacrylamidgel aufgetragen. Nach der Auftrennung bei 120 Volt über 3 bis 4 Stunden wurden die Gele mit SYBR[®]-Gold gefärbt.

2.4 Statistik

2.4.1 Berechnung der Allelfrequenzen

Als Allelfrequenz wird die Häufigkeit bezeichnet, mit der ein Allel (A oder B) an einem Genlocus innerhalb eines Kollektivs auftritt. Bei den in dieser Dissertation vorkommenden Polymorphismen wurde jeweils aus der beobachteten Häufigkeit der Genotypen (AA, AB, BB) der prozentuale Anteil der beiden Allele bestimmt.

2.4.2 Hardy-Weinberg-Gleichgewicht

In den Jahren 1908 und 1909 formulierten der englische Mathematiker Godfrey Harold Hardy und der deutsche Arzt Wilhelm Weinberg unabhängig voneinander ein Gesetz, das die Verteilung von Erbmerkmalen in Populationen beschreibt. In einer idealen Population bleiben die Allelfrequenz und die Allelverteilung, also die Häufigkeit von Homozygoten und Heterozygoten, über Generationen hinweg konstant, wenn sich die Population im Gleichgewicht befindet. Voraussetzungen dafür sind Panmixie, keine Selektion, keine Genwanderungen und dass die Population sehr groß ist.

Mit Hilfe des Hardy-Weinberg-Gesetzes kann die erwartete Häufigkeit der Allele berechnet werden. Bezeichnet man die Häufigkeit des Allels A mit p und die Häufigkeit des Allels B mit q , so gilt: $p + q = 1$ (100 %).

In der nachfolgenden Generation erscheinen dann die Genotypen (AA, AB, BB) mit definierten Häufigkeiten:

Homozygot AA	$p \times p = p^2$
Heterozygot AB und BA	$p \times q + q \times p = 2pq$
Homozygot BB	$q \times q = q^2$
Zusammengefasst:	$p^2 + 2pq + q^2 = 1$

2.4.3 χ^2 -Test und Fisher's exakter Test

Gegenstand des χ^2 -Test ist die Analyse von Häufigkeitsunterschieden von Merkmalen. Für den Vergleich der beobachteten mit der erwarteten Häufigkeit der Genotypen der jeweiligen Polymorphismen wurde der χ^2 -Anpassungstest angewandt. Als Nullhypothese wurde die Gleichverteilung der Genotypen in Stichprobe und Grundgesamtheit formuliert. Bei einem p -Wert $<0,05$ muss die Nullhypothese verworfen werden.

Um die Allel- und Genotypfrequenzen der Polymorphismen des DCM-Kollektiv mit den entsprechenden Frequenzen eines HCM-Kollektivs zu vergleichen, wurde der χ^2 -Unabhängigkeitstest benutzt. Bei einigen Allel- und Genotypfrequenzen wurde der exakte Test nach Fisher angewendet. Werte von $p <0,05$ als signifikant angesehen.

Die statistische Berechnung wurde unter Verwendung des Programms SPSS 11.0 durchgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 Klinische Befunde des Patientenkollektivs

Das Patientenkollektiv bestand aus 46 DCM-Patienten, 38 männlichen und 8 weiblichen Personen im Alter von 12 bis 45 Jahren. Das Durchschnittsalter betrug $34,5 \pm 7,6$ Jahre, das Alter zum Zeitpunkt der Diagnose lag bei $29,5 \pm 7,9$ Jahren. Die klinischen Daten dieser Patienten sind in Tabelle 3-1 zusammengefasst.

Tabelle 3-1: Klinische Daten der 46 Patienten

Geschlecht, % (n)			
männlich	83 % (38)	weiblich	17 % (8)
Alter, Jahre			
bei Diagnose	$29,5 \pm 7,9$	bei Studie	$34,5 \pm 7,6$
NYHA-Stadium, % (n)			
I	13 % (6)	III	46 % (21)
II	39 % (18)	IV	2 % (1)
Rhythmus, % (n)			
Sinusrhythmus	85 % (39)	ICD	28 % (13)
Vorhofflimmern	15 % (7)		
Echokardiographie / Herzkatheter			
LVEDD, mm	$70,6 \pm 10,4$	LVEF, %	$22,3 \pm 8,4$
Korrigierter LVEDD, %	$141,7 \pm 20,2$	VF, %	$14,7 \pm 7,4$
LVESD, mm	$60,1 \pm 11,1$	PAPm, mmHg	$27,1 \pm 10,1$
Medikamente, % (n)			
ACE-Hemmer	80 % (37)	β -Blocker	52 % (24)
ATII-Antagonisten	7 % (3)	Antiarrhythmika	11 % (5)
Diuretika	78 % (36)	Marcumar	26 % (12)
Digitalis	80 % (37)		

Die Daten sind als Mittelwerte und Standardabweichung oder als relative (%) und absolute Werte (n) angegeben. Abkürzungen: NYHA = New York Heart Association, ICD = implantierbarer Cardioverter-Defibrillator, LVEDD = linksventrikulärer enddiastolischer Durchmesser, LVESD = linksventrikulärer endsystolischer Durchmesser, LVEF = linksventrikuläre Ejektionsfraktion, VF = Verkürzungsfraktion, PAPm = mittlerer Pulmonalarteriendruck.

Bei allen Patienten wurde die Krankheit echokardiographisch diagnostiziert. Der LVEDD war größer als 117 % des für das Alter und für die Körperoberfläche entsprechenden Normwertes und bei allen Patienten waren die LVEF kleiner als 45 % und / oder die VF kleiner als 25 %. Auch eine hypertrophe Kardiomyopathie wurde bei allen Patienten echokardiographisch ausgeschlossen.

Zum Zeitpunkt der Studie waren bereits sieben Patienten verstorben, sechs Patienten hatten bereits ein Herztransplantat erhalten, 13 sind Träger eines implantierbaren Cardioverter-Defibrillators (ICD).

3.2 β -MHC

Bei 46 nicht verwandten Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie wurde eine systematische Mutationssuche im β -MHC-Gen durchgeführt. Es wurden die Exone 3 bis 23 untersucht sowie die Exon-flankierenden Intronbereiche. Insgesamt konnten zehn Varianten festgestellt werden (Tab. 3-2). Die Bezeichnung der Varianten entspricht den Empfehlungen von Dunnen et al. und der Human Genome Variation Society [97, 98]. Als Referenz-Sequenz wurde eine genomische DNA-Sequenz verwendet (GenBank Accession Number M57965.1). Den Nukleotidpositionen ist daher ein „g.“ vorangestellt. Es wurden zwei potentiell krankheitsrelevante Mutationen ermittelt, die jeweils eine Aminosäuresubstitution zur Folge haben. In Exon 8 führt eine Nukleotidsubstitution von Guanin zu Adenin an Nukleotidposition g.7799 zu einem Austausch der Aminosäure Alanin zu Threonin in Kodon 223 (Ala223Thr). Eine Transition von Cytosin zu Thymin in Exon 17 (g.12164) hat den Austausch von Serin gegen Leucin im Kodon 642 zur Folge (Ser642Leu). Beide Mutationen konnten in einer Kontrollgruppe aus 88 gesunden Blutspendern nicht gefunden werden.

Tabelle 3-2: Identifizierte Mutationen und Polymorphismen im β -MHC-Gen

Variante	Nukleotidposition und -substitution	Exon / Intron	Nachweismethode
Missense-Mutationen			
Ala223Thr	g.7799G>A	Exon 8	Sequenzierung, 88 Kontrollen
Ser642Leu	g.12164C>T	Exon 17	Sequenzierung, 88 Kontrollen
Seltene genetische Varianten mit unklarer funktioneller Relevanz			
IVS11+23A>T	g.8914A>T	Intron 11	Sequenzierung
Asp376Asp	g.9666C>T	Exon 12	Sequenzierung
Polymorphismen			
IVS2-25G>T	g.5688G>T	Intron 2	RFLP-Analyse (+ Bsg I)
Thr63Thr	g.5909C>T	Exon 3	RFLP-Analyse (+ Dde I)
Phe244Phe	g.7864C>T	Exon 8	Sequenzierung
Asp325Asp	g.8867C>T	Exon 11	Sequenzierung
Gly354Gly	g.9600C>T	Exon 12	RFLP-Analyse (- Hin6 I)
Lys365Lys	g.9633G>A	Exon 12	Sequenzierung

Kodon- und Nukleotidposition sind nach Jaenicke et al. (GenBank Accession Number M57965.1) angegeben. g. = genomische DNA.

Des Weiteren fanden sich eine Mutation in Intron 11 und eine synonyme Mutation in Exon 12. In Intron 11 liegt die Mutation IVS11+23A>T (g.8914A>T) außerhalb von Spleiß-Konsensussequenzen, ein Einfluss auf das Spleißen der mRNA ist daher unwahrscheinlich. Die Mutation Asp376Asp (g.9666C>T) in Exon 12 ist synonym, GAC wird gegen GAT ausgetauscht, so dass die Aminosäure Aspartat erhalten bleibt.

Neben den beschriebenen seltenen Varianten wurden sechs Polymorphismen identifiziert. Alle werden durch den Austausch eines einzelnen Nukleotids verursacht: in Intron 2 IVS2-25G>T (g.5688G>T), in Exon 3 Thr63Thr (g.5909G>T), in Exon 8 Phe244Phe (g.7864C>T), in Exon 11 Asp325Asp (g.8867C>T) und in Exon 12 Gly354Gly (g.9600C>T) und Lys365Lys (g.9633G>A). Bei keinem der Polymorphismen kommt es zu einer Änderung der Aminosäuresequenz.

Bei allen sechs Polymorphismen wurden die Genotypen der 46 DCM-Patienten bestimmt. Dadurch konnten jeweils die Allelfrequenz und die nach dem Hardy-Weinberg-Gesetz erwarteten Genotyp-Häufigkeiten berechnet werden. Schließlich wurde mittels des Chi²-Tests das Abweichen vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht überprüft. Als Kontrollkollektiv wurden bereits genotypisierte HCM-Patienten aus der DNA-Datenbank des Deutschen Herzzentrums Berlin herangezogen.

Die Lokalisation der identifizierten genetischen Varianten ist in der Intron-Exon-Struktur des β -MHC-Gens dargestellt (Abb. 3-1).

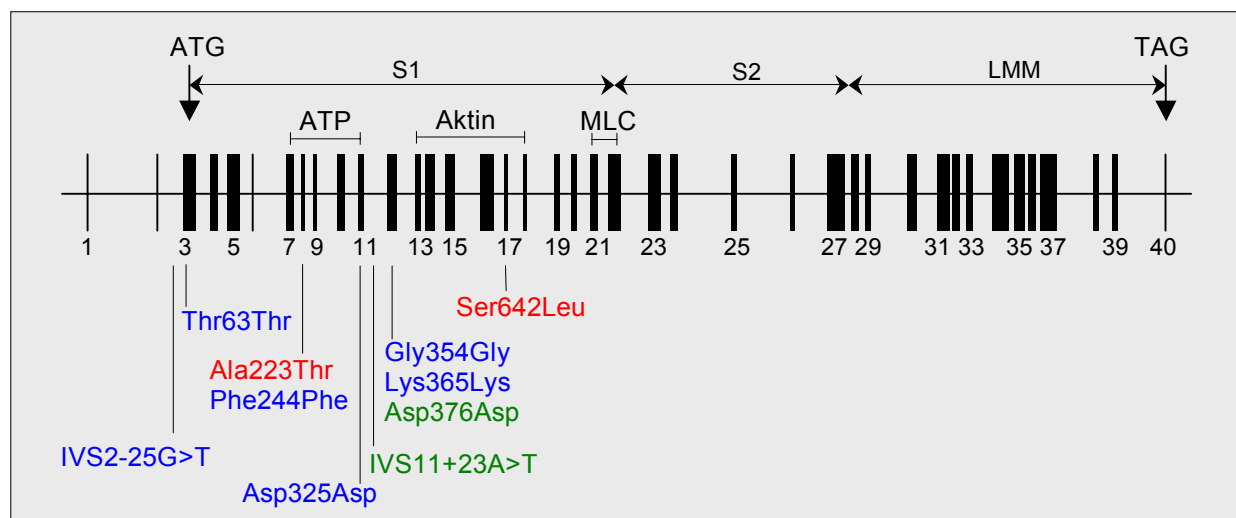


Abbildung 3-1: Lokalisation der Varianten im β -MHC-Gen

Schematische Darstellung des β -MHC-Gens. Die senkrechten Balken repräsentieren die Exone, die Zwischenräume die Introne. Die in dieser Arbeit identifizierten Varianten sind rot (Missense-Mutationen), grün (seltene genetische Varianten) und blau (Polymorphismen) eingezeichnet.

ATG und TAG sind Start- und Stoppcodons der Translation. Die Hauptstrukturkomponenten des Myosins sind Subfragment S1 (Kopf) und Subfragment S2 + Light Meromyosin LMM (Schwanz). Funktionell relevante Regionen sind ATP: ATP-Bindung, Aktin: Aktin-Interaktion und MLC: Bindung von leichten Ketten.

3.2.1 Missense-Mutationen

3.2.1.1 Ala223Thr (g.7799G>A)

In Exon 8 des β -MHC-Gens konnte in der SSCP-Analyse bei Raumtemperatur eine Laufmusterabweichung bei Indexpatient 1745 identifiziert werden (Abb. 3-2A). Durch die DNA-Sequenzierung des aberranten PCR-Fragments wurde eine G>A Substitution an Nukleotidposition g.7799 ermittelt (Abb. 3-2B). Aufgrund dieser Transition kommt es in Kodon 223 zum Austausch der unpolaren Aminosäure Alanin (GCC) gegen die polare Aminosäure Threonin (ACC).

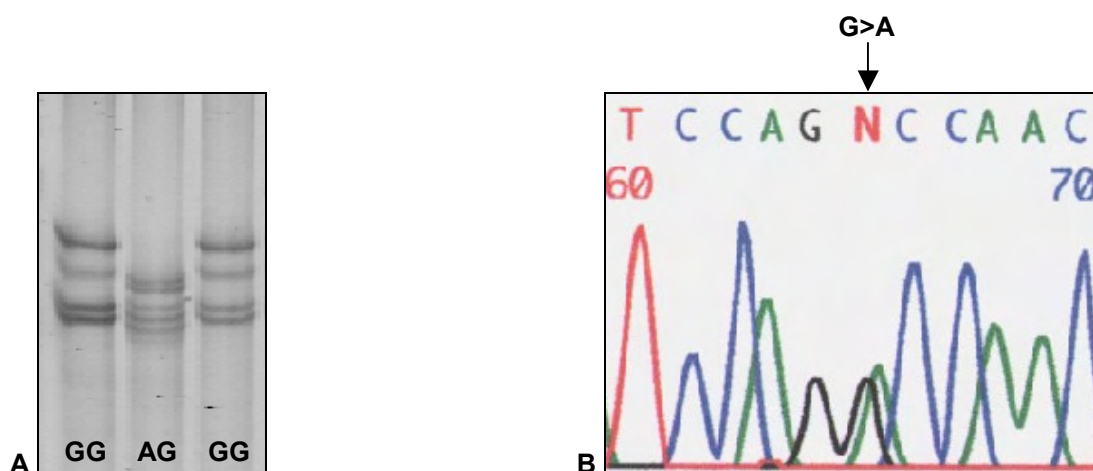


Abbildung 3-2: Variante Ala223Thr (g.7799G>A)

A) SSCP-Analyse von Exon 8 bei Raumtemperatur. Die mittlere Spur zeigt das aberrante Laufmuster des DNA-Fragments des Mutationsträgers. **B)** Die DNA-Sequenzierung dieses Fragments ergab eine Nucleotidsubstitution von Guanin zu Adenin an Position g.7799 (Pfeil).

Da die Nucleotidposition g.7799 nicht in der Erkennungssequenz eines Restriktionsenzym liegt, konnte keine RFLP-Analyse etabliert werden. Zur Bestätigung der Mutation wurden deshalb mehrere unabhängige PCR-Amplifikate sequenziert. Darüber hinaus wurden 88 Kontrollproben gesunder Blutspender und 136 Proben von HCM-Patienten mittels SSCP-Analyse auf diese Variante untersucht, in keiner der Proben war die Mutation in Exon 8 vorhanden.

Die Aminosäure Alanin an Position 223 ist evolutionär konserviert, man findet sie bei Mensch, Schwein, Ratte, Huhn und Kammuschel. *Drosophila melanogaster* hat an dieser Position bereits die Aminosäure Threonin (Abb. 3-3).

Mensch	kardiales β -MHC	(M57965.1)	GTLEDQIIQANPALEAFGN
Mensch	kardiales α -MHC	(P13533)
Schwein	kardiales β -MHC	(U75316)
Ratte	kardiales α -MHC	(P02563)G.....
Mensch	perinatale Skelettmuskulatur	(P13535)S...L.....
Mensch	Skelettmuskulatur Typ IIa	(AAD29950)S...L.....
Huhn	Skelettmuskulatur	(P13538)S...L.....
Kammuschel	quergestreifte Muskulatur	(AAB19994)	.S.....G...V...Y..
Drosophila	Muskulatur	(AAA28687)	.S....VV.T..V.....

Abbildung 3-3: Alignment β -MHC Ala223

Homologievergleich der Proteinsequenz verschiedener Spezies im Bereich der Mutation Ala223Thr. Identische Aminosäuren sind als Punkte angegeben. Der Kasten markiert die Position 223 der Proteinsequenz von β -MHC. Alanin ist an dieser Position evolutionär konserviert, lediglich *Drosophila melanogaster* weist dort die Aminosäure Threonin auf. GenBank Accession Number in Klammern.

Der klinische Befund des Patienten ist typisch für das Bild einer dilatativen Kardiomyopathie. Echokardiographisch stellte sich ein LVEDD von 82 mm, ein LVESD von 70 mm, eine LVEF von 10 % und eine VF von 15 % dar. In der Herzkatheteruntersuchung wurde ein mittlerer Pulmonalarteriendruck von 33 mmHg gemessen. Die medikamentöse Therapie umfasste ACE-Hemmer, Diuretikum, Aldosteron-Antagonist, Digitalis und β -Blocker, er ist Träger eines implantierbaren Cardioverter-Defibrillators. Unter den therapeutischen Maßnahmen hat der Patient einen Sinusrhythmus, das Stadium der Herzinsuffizienz entspricht NYHA II. Da der Patient aus Bosnien stammt und sich nur vorübergehend in Deutschland aufhielt, konnte nicht geklärt werden, ob weitere Familienmitglieder an einer dilatativen Kardiomyopathie erkrankt sind.

3.2.1.2 Ser642Leu (g.12164C>T)

Mittels SSCP-Analyse von Exon 17 bei Raumtemperatur wurde bei Indexpatient 474 eine Laufmusterabweichung festgestellt (Abb. 3-4A). Die Sequenzierung des abweichenden PCR-Fragments ergab eine C>T Transition an Nukleotidposition g.12164 (Abb. 3-4B). Diese Substitution führt zu einem Austausch der polaren Aminosäure Serin (TCG) zu der unpolaren Aminosäure Leucin (TTG) in Kodon 642. Die Mutation wurde durch mehrmaliges Sequenzieren neuer unabhängiger PCR-Fragmente bestätigt, da die Variante nicht im Bereich einer Erkennungssequenz eines Restriktionsenzym liegt. Zur weiteren Bestätigung wurden 88 Kontrollproben gesunder Blutspender mittels SSCP-Analyse untersucht, bei keinem der Blutspender wurde die Mutation gefunden. Auch bei 136 HCM-Patienten aus dem Patientenkollektiv des Deutschen Herzzentrums Berlin war die Mutation nicht vorhanden.

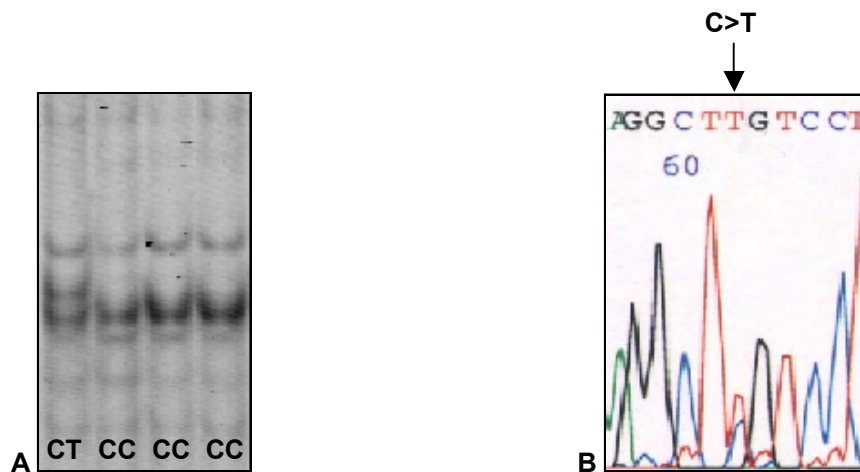


Abbildung 3-4: Variante Ser642Leu (g.12164C>T)

A) SSCP-Analyse von Exon 17 bei Raumtemperatur. Die erste Spur zeigt das abweichende Laufmuster.
B) DNA-Sequenzierung dieses Fragments mit einem Austausch von Cytosin (blau) zu Thymin (rot).

Die Aminosäure Serin an Position 642 ist in verschiedenen Spezies konserviert, bei *Drosophila melanogaster* befindet sich Glycin an dieser Position (Abb. 3-5).

Mensch	kardiales β -MHC	(M57965.1)	KKGSSSFQTVSALHRENLNKLM
Mensch	kardiales α -MHC	(P13533)
Schwein	kardiales β -MHC	(U75316)
Ratte	kardiales α -MHC	(P02563)
Mensch	perinatale Skelettmuskulatur	(P13535)F.....
Mensch	Skelettmuskulatur Typ IIa	(AAD29950)F.....
Huhn	Skelettmuskulatur	(P13538)F.....
Kammuschel	quergestreifte Muskulatur	(AAB19994)	G.S.A...I.V...S.....
<i>Drosophila</i>	Muskulatur	(AAA28687)	...GG.A...SAYK.Q..S..

Abbildung 3-5: Alignment Ser642

Homologievergleich der Proteinsequenz verschiedener Spezies im Bereich der Mutation Ser642Leu. Identische Aminosäuren sind als Punkte angegeben. Der Kasten markiert die Position 642 der Proteinsequenz von β -MHC. Serin ist an dieser Position evolutionär konserviert. In Klammern ist die jeweilige GenBank Accession Number angegeben.

Phänotypisch zeigt der Patient das typische Bild der DCM. Im Echokardiogramm wurden folgende Werte gemessen: LVEDD 70 mm, LVESD 55 mm, LVEF 10 % und VF 14 %. In der Herzkatheteruntersuchung wurde ein mittlerer Pulmonalarteriendruck von 33 mmHg ermittelt. Unter der Therapie von ACE-Hemmer, Diuretikum, Aldosteron-Antagonist, Digitalis, β -Blocker, Antiarrhythmikum und ICD weist der Patient einen Sinusrhythmus auf. Die Herzinsuffizienz entspricht nach NYHA dem Stadium II. Auch bei diesem Patienten konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt werden, ob weitere Familienmitglieder an einer DCM leiden.

3.2.1.3 STRAP-Analyse der Mutationen Ala223Thr und Ser642Leu

Die beiden Missense-Mutationen Ala223Thr und Ser642Leu wurden von der Arbeitsgruppe Frömmel an der Charité mit dem STRAP-Programm (Editor for Structural Alignment of Proteins) auf die Proteinstruktur des Myosins projiziert (Abb. 3-6). Da die Struktur des kardialen Proteins nicht zur Verfügung stand, wurden die Mutationen auf das Myosin der quergestreiften Muskulatur projiziert. Dadurch konnten die in dieser Arbeit gefundenen neben bereits bekannten Mutationen in der dreidimensionalen Struktur des Proteins dargestellt werden.

Die Mutation Ala223Thr liegt in der Nähe der ATP-Bindungsstelle, in der oberen 50 kDa Domäne des β -MHC. Die Projektion der Mutation Ser642Leu auf die Proteinstruktur zeigt, dass diese in einer Schleife des Myosins liegt, die direkt mit Aktin interagiert und so die Aktin-Myosin-Interaktion beeinflussen könnte.

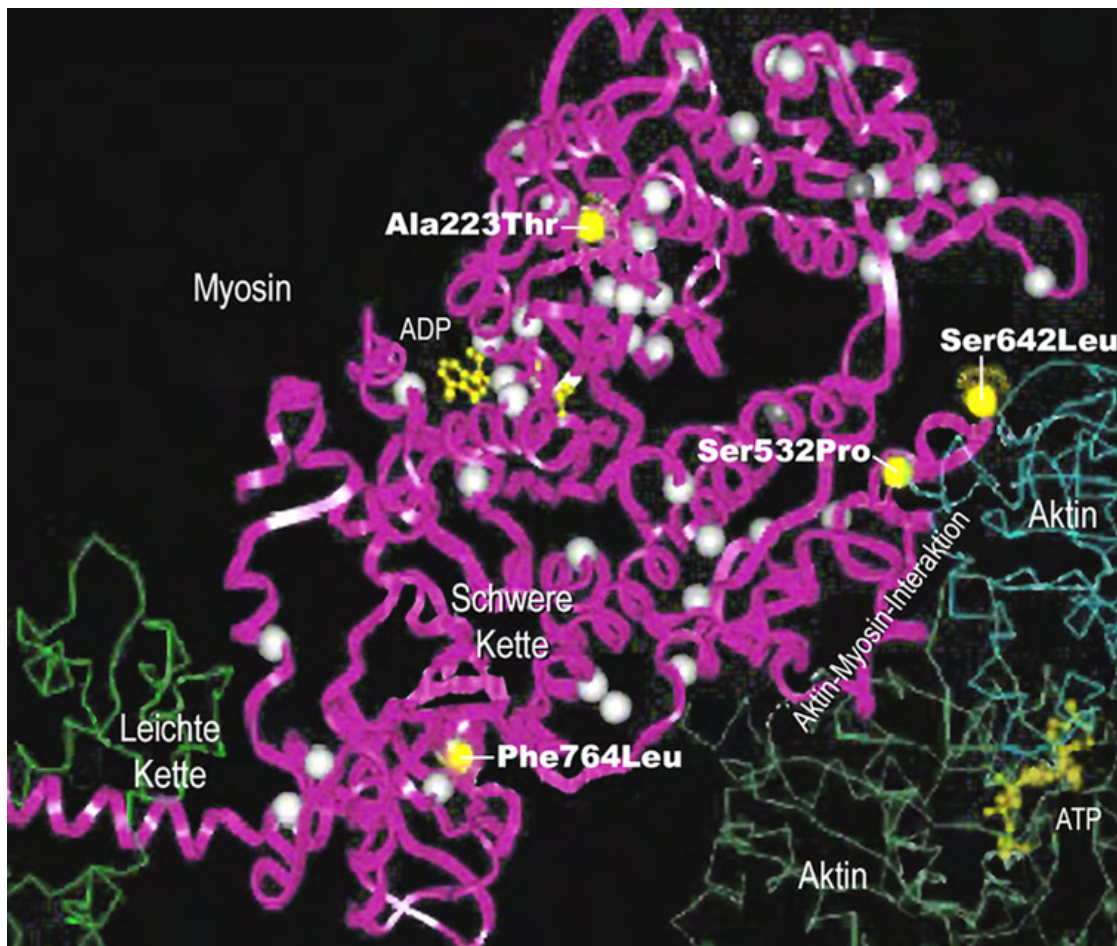


Abbildung 3-6: STRAP-Analyse der Mutationen im β -MHC-Gen

Mutationen im β -MHC-Gen sind auf die Proteinstruktur des Myosins projiziert, dabei sind HCM-assoziierte Mutationen grau dargestellt und DCM-assoziierte Mutationen gelb. Dies sind die beiden in dieser Arbeit identifizierten Mutationen Ala223Thr und Ser642Leu, und die bereits bekannten Ser532Pro und Phe764Leu. Ser532Pro und Ser642Leu befinden sich in der Aktin-Bindungsregion.

3.2.2 Seltene genetische Varianten mit unklarer funktioneller Relevanz

3.2.2.1 IVS11+23A>T (g.8914A>T)

In der SSCP-Analyse von Exon 11 wurde zunächst ein Polymorphismus in Kodon 325 beobachtet (siehe 3.2.3.4). Die DNA-Sequenzierung der vier aberranten Laufmuster-Proben ergab bei Indexpatient 466 jedoch zusätzlich eine Nukleotidsubstitution Adenin zu Thymin an Position g.8914 (Abb. 3-7). Die Variante liegt in Intron 11 außerhalb von Spleiß-Konsensussequenzen, ein Einfluss auf das Spleißen der mRNA ist daher unwahrscheinlich. Es kommt also nicht zu einer Änderung der Aminosäuresequenz.

Der Nukleotidaustausch zerstört eine Schnittstelle für das Restriktionsenzym PflM I. Der Restriktionsverdau konnte jedoch nicht optimiert werden, so dass die Mutation durch erneute Sequenzierung eines unabhängigen PCR-Produkts bestätigt wurde.

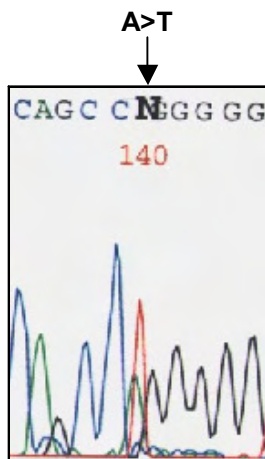


Abbildung 3-7: DNA-Sequenzierung der Variante IVS11+23A>T (g.8914A>T)

Der Pfeil markiert die Position +23 im Intron 11. Hier kommt es zu einem Austausch von Adenin (grün) zu Thymin (rot).

3.2.2.2 Asp376Asp (g.9666C>T)

In Exon 12 war eine Variante bei Indexpatient 474 erkennbar. Dieser Patient trägt außerdem die bereits beschriebene Mutation Ala223Thr in Exon 8 (siehe 3.2.1.1). Die Laufmusterabweichung war weder bei Raumtemperatur noch bei 4° C eindeutig sichtbar (Abb. 3-8A). Durch die mehrfach unabhängige DNA-Sequenzierung des auffälligen PCR-Fragments konnte die Mutation in Exon 12 jedoch bestätigt werden (Abb. 3-8B). Eine RFLP-Analyse schied hier aus, da kein passendes Restriktionsenzym vorhanden war. An Nukleotidposition g.9666 kommt es zu einem Basenaustausch C>T. Die Aminosäure Aspartat an Kodon-Position 376 bleibt erhalten (GAC>GAT).

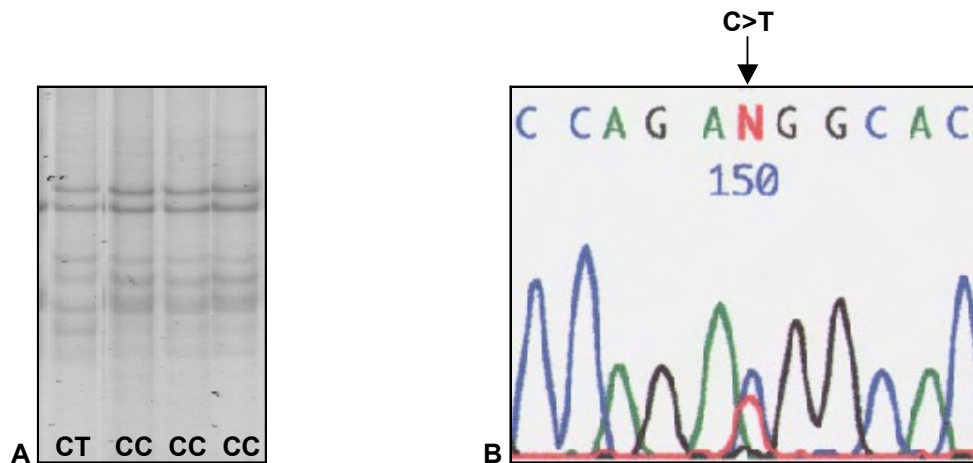


Abbildung 3-8: Variante Asp376Asp (g.9666C>T)

A) SSCP-Analyse bei 4° C. Ein abweichendes Muster ist in der ersten Spur im Vergleich zu den benachbarten Spuren nur angedeutet. **B)** Die DNA-Sequenzierung dieses Fragments identifizierte die Variante Asp376Asp mit einem Austausch von GAC zu GAT.

3.2.3 Polymorphismen

3.2.3.1 IVS2-25G>T (g.5688G>T)

Bei der SSCP-Analyse von Exon 3 war erkennbar, dass es sich in diesem Fragment um zwei unabhängige Polymorphismen handelt. Es konnten die in Abbildung 3-9A dargestellten Bandenmuster beobachtet werden. Die DNA-Sequenzierung der ausgewählten PCR-Fragmente zeigte einen Polymorphismus an Nucleotidposition g.5688, hier kommt es zu einer G>T Transversion (Abb. 3-10). Dies führt nicht zu einem Aminosäureaustausch, weil die Substitution in Intron 2 an Stelle -25 liegt.

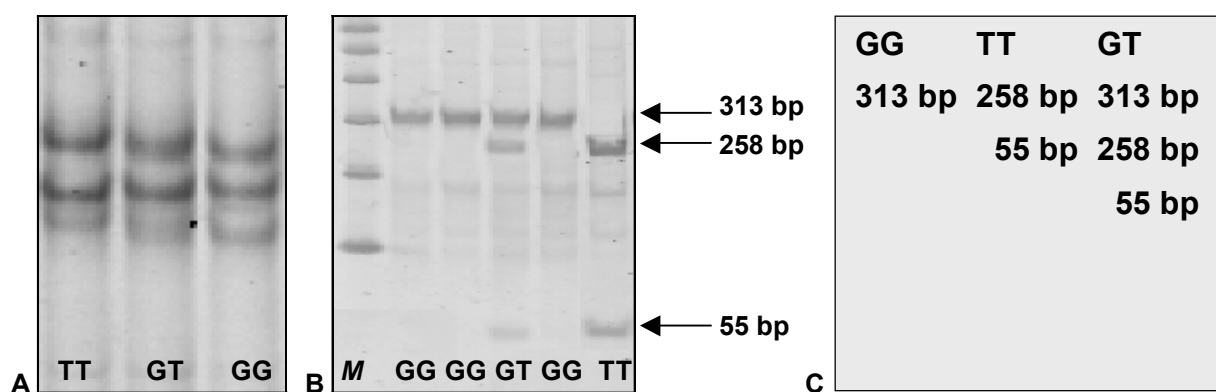


Abbildung 3-9: Variante IVS2-25G>T (g.5688G>T)

A) SSCP-Analyse bei Raumtemperatur. Dargestellt sind die verschiedenen Bandenmuster der drei Genotypen. **B)** Gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte von Exon 3 nach enzymatischer Spaltung mit Bsp I. Je nach Genotyp entstehen Fragmente mit einer Länge von 313 bp, 258 bp und 55 bp (Pfeile), M = 100 bp-DNA-Ladder. **C)** Restriktionsfragment-Längen der drei Genotypen.

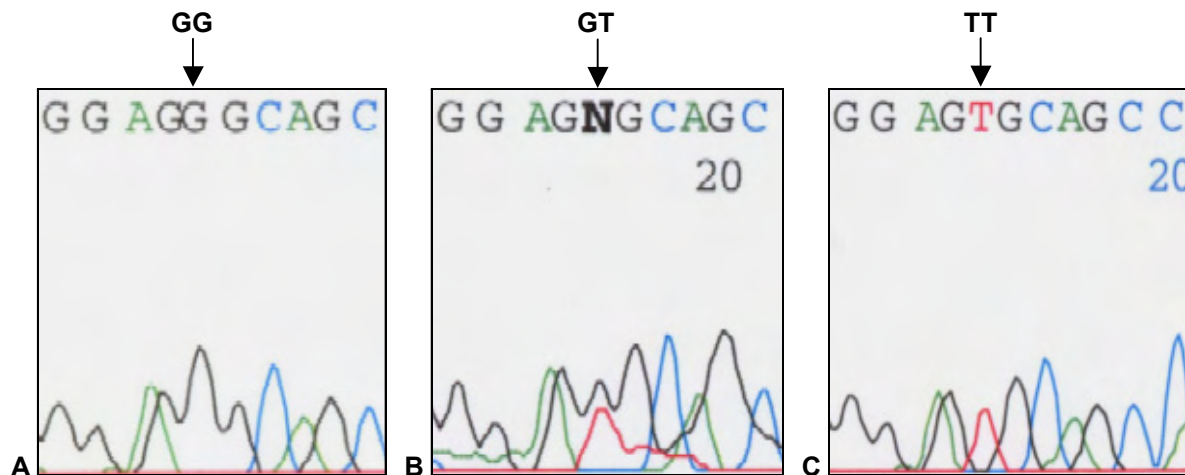


Abbildung 3-10: DNA-Sequenzierung der Variante IVS2-25G>T (g.5688G>T)

Im Patientenkollektiv waren alle drei Genotypen vorhanden: **A)** Wildtyp homozygot (GG), **B)** heterozygot (GT), **C)** Mutante homozygot (TT).

Durch den Nukleotidaustausch entsteht eine Erkennungssequenz für das Restriktionsenzym Bsg I (gtgcag(n)₁₆). Die Amplifikation mit den Primern β -MHC-Exon 3F/R ergibt ein Fragment von 313 Basenpaaren. Beim Restriktionsverdau des homozygoten Wildtyps (GG) behält das Fragment seine volle Länge, die Mutante (TT) wird in zwei Teilstücke von 258 bp und 55 bp geschnitten, der heterozygote Genotyp weist nach enzymatischer Spaltung alle drei Fragmentlängen auf. Anhand der gelelektrophoretischen Auftrennung der Restriktionsfragmente (Abb. 3-9B) wurde der jeweilige Genotyp von allen 46 DCM-Patienten bestimmt.

3.2.3.2 Thr63Thr (g.5909C>T)

In der SSCP-Analyse von Exon 3 war neben der Variante IVS2-25G>T noch ein weiterer Polymorphismus sichtbar (Abb. 3-11A). Die DNA-Sequenzierung ergab die Transition C>T an Nukleotidposition g.5909. Dieser Basenaustausch in Kodon 63 führt nicht zu einer Änderung der Aminosäuresequenz, da sowohl das Kodon ACC als auch das Triplet ACT für die Aminosäure Threonin kodieren (Abb. 3-12).

Die Nukleotidsubstitution Thr63Thr (g.5909C>T) liefert eine Schnittstelle für das Enzym Dde I (c/ttag). Die DNA-Proben aller 46 Patienten wurden mit den Primern β -MHC-Exon 3F/R amplifiziert und mit Dde I verdaut, um so die Genotypen bestimmen zu können. Das Enzym schneidet das Amplifikat in zwei Teile von 255 bp und 58 bp. Damit sind Wildtyp, Mutante und heterozygoter Genotyp in der gelelektrophoretischen Auftrennung der Restriktionsfragmente eindeutig differenzierbar (Abb. 3-11B).

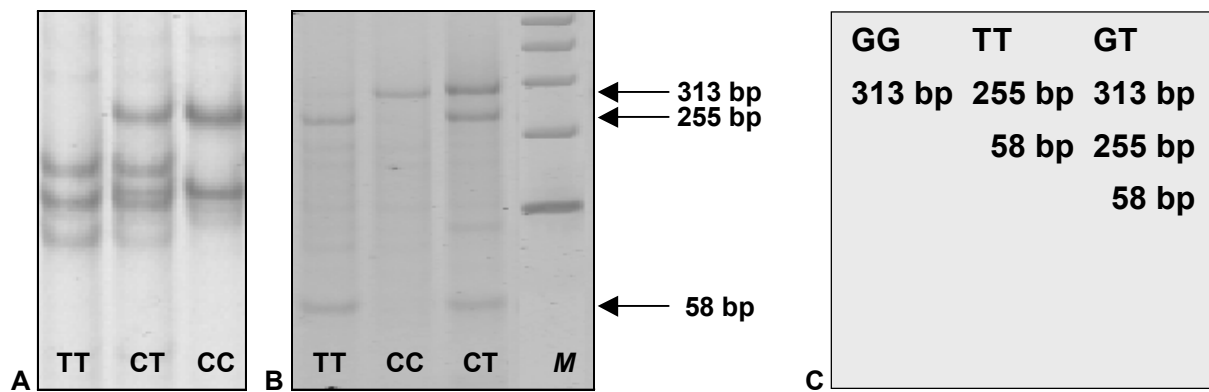


Abbildung 3-11: Variante Thr63Thr (g.5909C>T)

A) SSCP-Analyse bei Raumtemperatur. Die verschiedenen Bandenmuster der drei Genotypen sind deutlich erkennbar. **B)** Gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte von Exon 3 nach enzymatischer Spaltung mit Dde I, M = 100 bp-DNA-Ladder. **C)** Restriktionsfragment-Längen der drei Genotypen.

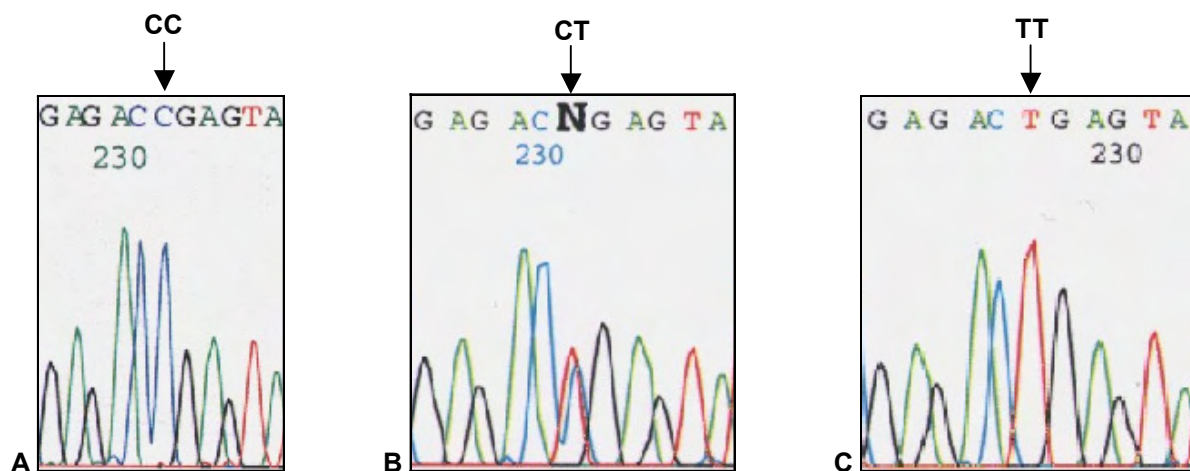


Abbildung 3-12: DNA-Sequenzierung der Variante Thr63Thr (g.5909C>T)

Die DNA-Sequenzierung von drei Proben mit unterschiedlichem Laufmuster in der SSCP-Analyse lieferte die Sequenz der drei Genotypen: **A)** Wildtyp homozygot (CC), **B)** heterozygot (CT), **C)** Mutante homozygot (TT).

3.2.3.3 Phe244Phe (g.7864C>T)

Anhand der SSCP-Analyse von Exon 8 konnte das in Abbildung 3-13 dargestellte auffällige Bandenmuster bei mehreren Patienten identifiziert werden. Die DNA-Sequenzierung ergab eine Nukleotidsubstitution C>T an Position g.7864. In Kodon 244 wird TTC gegen TTT ausgetauscht, dies führt nicht zu einem Austausch der Aminosäure Phenylalanin (Abb. 3-14).

Da der Austausch weder zu einer Neubildung noch zu einer Zerstörung von Restriktionsstellen führt, wurde der Polymorphismus durch wiederholte Sequenzierung von unabhängigen PCR-Produkten bestätigt.

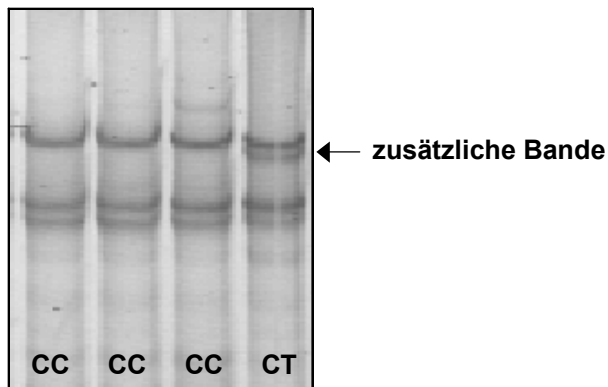


Abbildung 3-13: Variante Phe244Phe (g.7864C>T)

SSCP-Analyse bei 4° C. Die rechte Spur zeigt im Vergleich zu den benachbarten Spuren eine zusätzliche Bande (Pfeil).

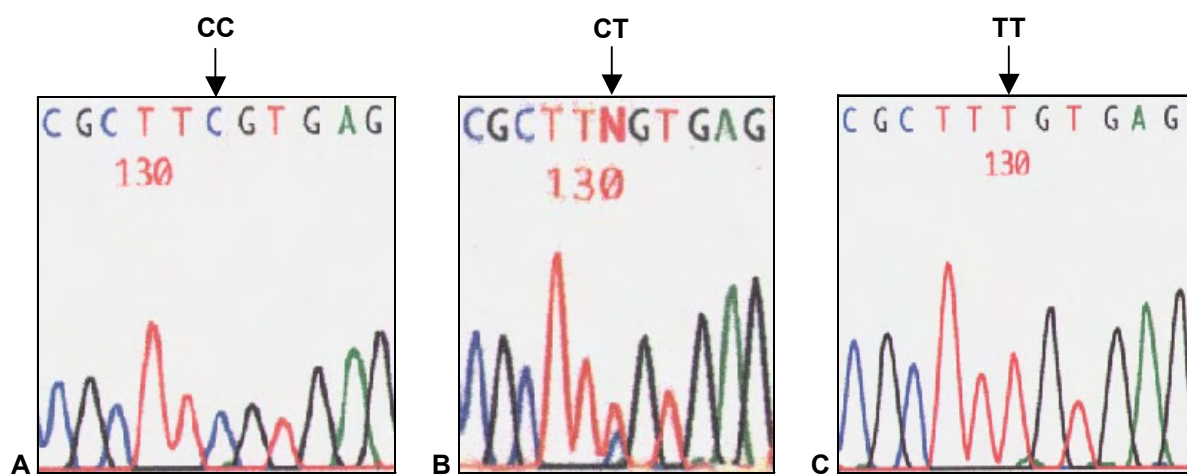


Abbildung 3-14: DNA-Sequenzierung der Variante Phe244Phe (g.7864C>T)

An Nukleotidposition g.7864 wurde ein Polymorphismus C>T identifiziert: **A)** Wildtyp homozygot (CC), **B)** heterozygot (CT), **C)** Mutante homozygot (TT).

Die Genotypisierung erfolgte anhand des SSCP-Gels bei Raumtemperatur. Auffällig ist, dass nur ein Patient homozygot für das T-Allel ist, wobei dieser gleichzeitig Träger der Mutation Ala223Thr in Exon 8 ist (siehe 3.2.1.1).

3.2.3.4 Asp325Asp (g.8867C>T)

Nach der SSCP-Analyse von Exon 11 wurde bei vier Patienten ein auffälliges Laufmuster beobachtet (Abb. 3-15A). Die DNA-Sequenzierung (Abb. 3-15B/C) zeigte eine Nukleotidsubstitution C>T an Position g.8867. Die Aminosäure Aspartat an Kodon-Position 325 bleibt erhalten (GAC>GAT).

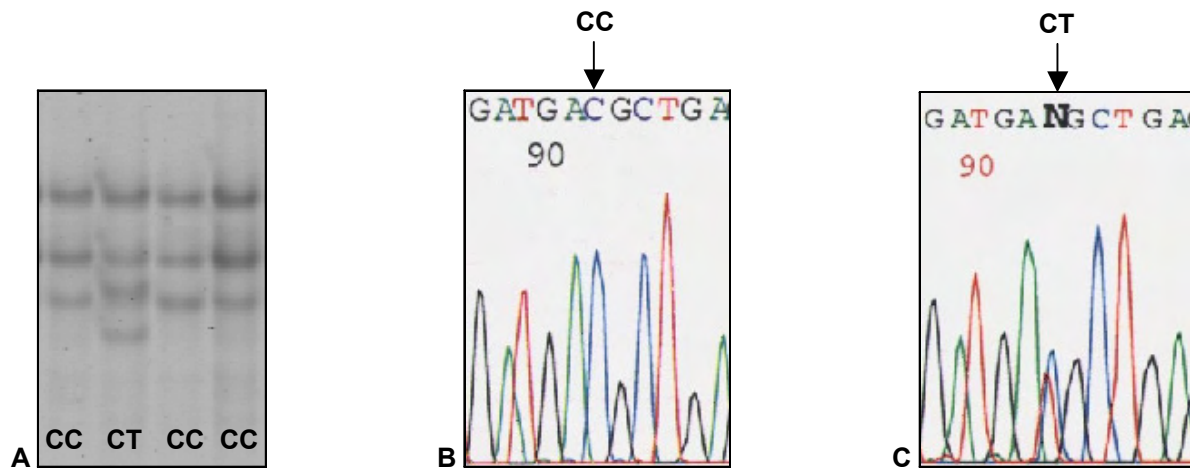


Abbildung 3-15: Variante Asp325Asp (g.8867C>T)

A) SSCP-Analyse bei Raumtemperatur. In der zweiten Spur ist ein aberrantes Bandenmuster erkennbar, lediglich vier Patienten des Kollektivs zeigten dieses Muster. **B)** DNA-Sequenzierung, Wildtyp homozygot (CC), **C)** heterozygot (CT).

3.2.3.5 Gly354Gly (g.9600C>T)

Die SSCP-Analyse von Exon 12 zeigte zwei unabhängige polymorphe Laufmusterabweichungen bei zahlreichen Proben. Das Bandenmuster des einen Polymorphismus ist in Abbildung 3-16A dargestellt. Durch die DNA-Sequenzierung (Abb. 3-16B/C) konnte die Transition C>T an Nukleotidposition g.9600 identifiziert werden, wodurch an Kodon-Position 354 das Triplet GGC durch GGT ersetzt wird. Beide Tripletts kodieren für die Aminosäure Glycin.

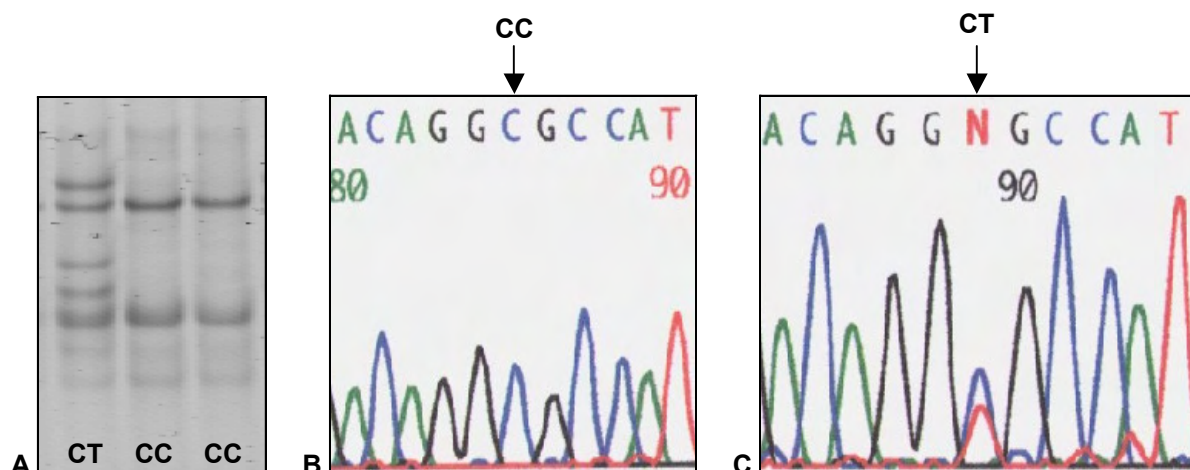


Abbildung 3-16: Variante Gly354Gly (g.9600C>T)

A) SSCP-Analyse bei 4° C. Die erste Spur zeigt einen heterozygoten Genotyp. **B)** DNA-Sequenzierung, Wildtyp homozygot (CC), **C)** heterozygot (CT).

Durch den enzymatischen Verdau mit der Restriktionsendonuklease Hin6 I (g/cgc) wurde der Polymorphismus Gly354Gly (g.9600C>T) bestätigt, da die Nukleotidsubstitution eine Erkennungssequenz des Enzyms zerstört. In der gelelektrophoretischen Auftrennung konnte der Genotyp nach folgendem Schema bestimmt werden: CC 114 bp/112 bp; TT 226 bp; CT 226 bp/114 bp/112 bp (Abb. 3-17).

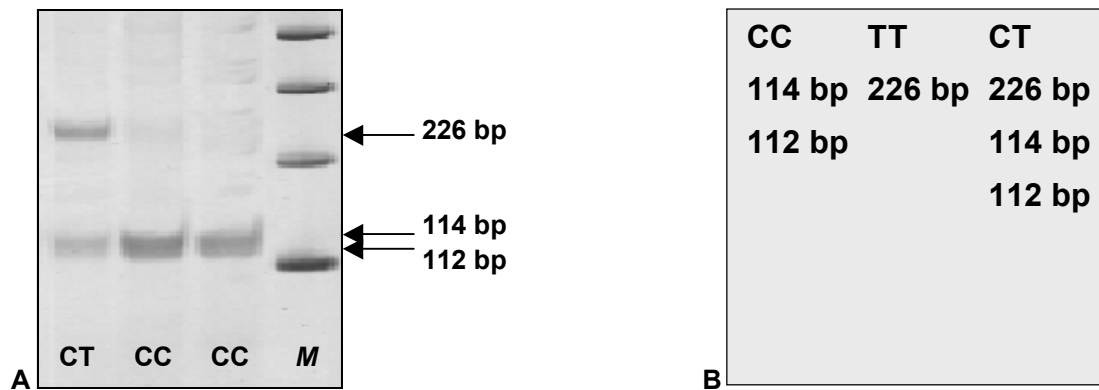


Abbildung 3-17: RFLP-Analyse der Variante Gly354Gly (g.9600C>T)

A) Gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte von Exon 12 nach enzymatischer Spaltung mit Hin6 I. Im Patientenkollektiv waren nur der homozygote Wildtyp und der heterozygote Genotyp vertreten, M = 100 bp-DNA-Ladder. **B)** Restriktionsfragment-Längen der Genotypen.

3.2.3.6 Lys365Lys (g.9633G>A)

Der zweite Polymorphismus in Exon 12 zeigte in der SSCP-Analyse bei 4° C das in Abbildung 3-18A dargestellte Bandenmuster. Die DNA-Sequenzierung ergab die Transition G>A an Nukleotidposition g.9633 (Abb. 3-18B/C). Hier ändert sich das Triplet von AAG zu AAA, die Aminosäure Lysin an Kodon-Position 365 bleibt erhalten.

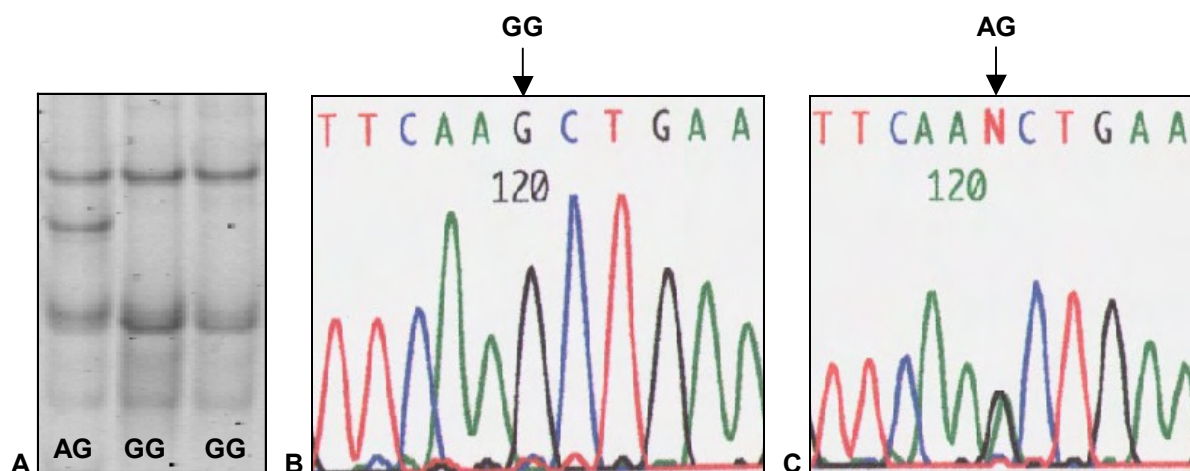


Abbildung 3-18: Variante Lys365Lys (g.9633G>A)

A) SSCP-Analyse bei 4° C. In der ersten Spur ist eine zusätzliche Bande sichtbar. **B)** Die DNA-Sequenzierung zeigt den homozygoten Wildtyp (GG) und **C)** den heterozygoten Genotyp (AG).

Die G>A Transition der Variante Lys365Lys zerstört eine Schnittstelle des Enzyms Alu I (ag/ct). Da die Erkennungssequenz dieses Enzyms unspezifisch ist, hat das PCR-Fragment des Wildtyps drei Schnittstellen, was nach enzymatischer Spaltung zu vier Banden in der gelelektrophoretischen Auftrennung führt. Der heterozygote Genotyp ist mit seinen fünf Banden nicht sicher vom Wildtyp zu unterscheiden, so dass auf die RFLP-Analyse verzichtet wurde. Die Bestätigung der Variante erfolgte durch wiederholte Sequenzierung unabhängiger PCR-Produkte. Die 46 DCM-Patienten wurden anhand des SSCP-Gels bei 4° C genotypisiert.

3.2.4 Statistische Auswertung der Polymorphismen im β -MHC-Gen

Die sechs identifizierten Polymorphismen im β -MHC-Gen wurden mit Hilfe des Chi²-Tests statistisch analysiert, um ein Abweichen der Genotypen des Kollektivs vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht zu überprüfen (Tab. 3-3).

Tabelle 3-3: β -MHC-Gen: Hardy-Weinberg-Gleichgewicht des DCM-Kollektivs (n = 46)

Variante	Allelfrequenz (%)	Beobachtete Häufigkeit	Erwartete Häufigkeit	p-Wert
IVS2-25G>T (g.5688G>T)	90 / 10	GG: 38 GT: 7 TT: 1	GG: 37,3 GT: 8,3 TT: 0,460	0,654
Thr63Thr (g.5909C>T)	54 / 46	CC: 12 CT: 26 TT: 8	CC: 13,4 CT: 22,9 TT: 9,7	0,649
Phe244Phe (g.7864C>T)	86 / 14	CC: 34 CT: 11 TT: 1	CC: 34,0 CT: 11,1 TT: 0,902	0,994
Asp325Asp (g.8867C>T)	96 / 4	CC: 42 CT: 4 TT: 0	CC: 42,4 CT: 3,5 TT: 0,074	0,928
Gly354Gly (g.9600C>T)	91 / 9	CC: 38 CT: 8 TT: 0	CC: 38,1 CT: 7,5 TT: 0,373	0,816
Lys365Lys (g.9633G>A)	82 / 18	GG: 29 AG: 17 AA: 0	GG: 30,9 AG: 13,6 AA: 1,5	0,291

Gegenüberstellung der beobachteten und nach dem Hardy-Weinberg-Gesetz erwarteten Genotyp-Häufigkeiten. Der Chi²-Test zeigt bei allen sechs Varianten keinen signifikanten Unterschied.

Bei allen Polymorphismen weisen beobachtete und nach dem Hardy-Weinberg-Gleichgewicht erwartete Häufigkeit der Genotypen keinen signifikanten Unterschied auf. Die p-Werte sind jeweils >0,05.

Um zu überprüfen, ob ein Allel oder Genotyp bei DCM oder HCM bevorzugt auftritt, wurden die jeweiligen Allel- und Genotypfrequenzen mit denen eines HCM-Kollektivs bereits genotypisierter Patienten aus dem Deutschen Herzzentrum Berlin verglichen. Die Analyse mit Hilfe des χ^2 -Unabhängigkeitstests bzw. des exakten Tests nach Fisher ergab auf dem Niveau von $p = 0,05$ keinen signifikanten Unterschied in der Allel- und Genotypfrequenz des jeweiligen Polymorphismus (Tab. 3-4).

Tabelle 3-4: β -MHC-Gen: Vergleich der Allel- und Genotypfrequenzen bei DCM und HCM

Variante	Allelfrequenz				Genotypfrequenz			
	Allel	DCM % (n)	HCM % (n)	p-Wert	Genotyp	DCM % (n)	HCM % (n)	p-Wert
Thr63Thr (g.5909C>T)	C:	54 % (50)	52 % (86)	0,769	CC:	26 % (12)	29 % (24)	0,502
	T:	46 % (42)	48 % (78)		CT:	57 % (26)	46 % (38)	
					TT:	17 % (8)	24 % (20)	
Phe244Phe (g.7864C>T)	C:	86 % (79)	83 % (172)	0,492	CC:	74 % (34)	70 % (73)	0,730
	T:	14 % (13)	17 % (36)		CT:	24 % (11)	25 % (26)	
					TT:	2 % (1)	5 % (5)	
Asp325Asp (g.8867C>T)	C:	96 % (88)	99 % (216)	0,066*	CC:	91 % (42)	98 % (107)	0,064*
	T:	4 % (4)	1 % (2)		CT:	9 % (4)	2 % (2)	
					TT:	0 % (0)	0 % (0)	
Gly354Gly (g.9600C>T)	C:	91 % (84)	91 % (136)	0,867	CC:	83 % (38)	83 % (62)	0,724
	T:	9 % (8)	9 % (14)		CT:	17 % (8)	16 % (12)	
					TT:	0 % (0)	1 % (1)	
Lys365Lys (g.9633G>A)	G:	82 % (75)	85 % (39)	0,634	GG:	63 % (29)	74 % (17)	0,184
	A:	18 % (17)	15 % (7)		AG:	37 % (17)	22 % (5)	
					AA:	0 % (0)	4 % (1)	

Bei fünf Polymorphismen wurden die Allel- und Genotypfrequenzen des DCM-Kollektivs mit den entsprechenden Frequenzen eines HCM-Kollektivs verglichen. Die statistische Analyse zeigt jeweils keinen signifikanten Unterschied. Für den Polymorphismus IVS2-25G>T waren keine genotypisierten HCM-Patienten verfügbar. * Fisher's exakter Test

3.3 Troponin T

Im Troponin T-Gen wurde bei den gleichen 46 DCM-Patienten, die auch im β -MHC-Gen untersucht wurden, ein systematisches Mutationsscreening der Exone 2 bis 16 mit den Exon-flankierenden Intronbereichen durchgeführt. Es wurden keine Mutationen identifiziert, jedoch zeigte die Analyse sechs Polymorphismen (Tab. 3-5).

Tabelle 3-5: Identifizierte Polymorphismen im Troponin T-Gen

Variante	Nukleotidposition und -substitution	Exon / Intron	Nachweismethode
Polymorphismen			
IVS3-11_IVS3-7dupCTTCT	g.6361_6365dupCTTCT	Intron 3	Heteroduplexanalyse
IVS5-50G>A	g.10553G>A	Intron 5	Sequenzierung
Ser69Ser	g.12739G>A	Exon 8	Sequenzierung
Ile106Ile	g.13150T>C	Exon 9	RFLP-Analyse (+ Taq I)
IVS11-32C>A	g.15978C>A	Intron 11	Sequenzierung
IVS14-33C>T	g.18708C>T	Intron 14	RFLP-Analyse (+ TspR I)

Kodon- und Nukleotidposition sind nach der GenBank Accession Number AY044273.1 angegeben. g. = genomische DNA.

Die Bezeichnung der Varianten wurde anhand der GenBank Accession Number AY044273.1 durchgeführt. Sie enthält die genomische Sequenz des gesamten Gens. Den Nukleotidpositionen ist daher ein „g.“ vorangestellt. Die Bezeichnung der Varianten entspricht den Empfehlungen von Dunnen et al. und der Human Genome Variation Society [97, 98].

In Intron 3 war eine Duplikation der fünf Basen CTTCT zu beobachten, IVS3-11_IVS3-7dupCTTCT (g.6361_6365dupCTTCT). Die anderen fünf Polymorphismen sind durch Nukleotidsubstitutionen gekennzeichnet, die nicht zu einer Änderung der Aminosäuresequenz führen. Im Einzelnen sind dies: IVS5-50G>A (g.10553G>A) in Intron 5, Ser69Ser (g.12739G>A) in Exon 8, Ile106Ile (g.13150T>C) in Exon 9, IVS11-32C>A (g.15978C>A) in Intron 11 und IVS14-33C>T (g.18708C>T) in Intron 14. Die Lokalisation der identifizierten genetischen Varianten ist in der Intron-Exon-Struktur des Troponin T-Gens dargestellt (Abb. 3-19).

Auch hier wurden bei allen sechs Polymorphismen die Genotypen der 46 DCM-Patienten bestimmt. Es konnte jeweils die Allelfrequenz und die nach dem Hardy-Weinberg-Gesetz erwartete Häufigkeit berechnet und schließlich mittels des Chi²-Tests

ein Abweichen vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht überprüft werden. Wie bei der Analyse des β -MHC-Gens dienten als Kontrollkollektiv genotypisierte HCM-Patienten des Deutschen Herzzentrums Berlin.

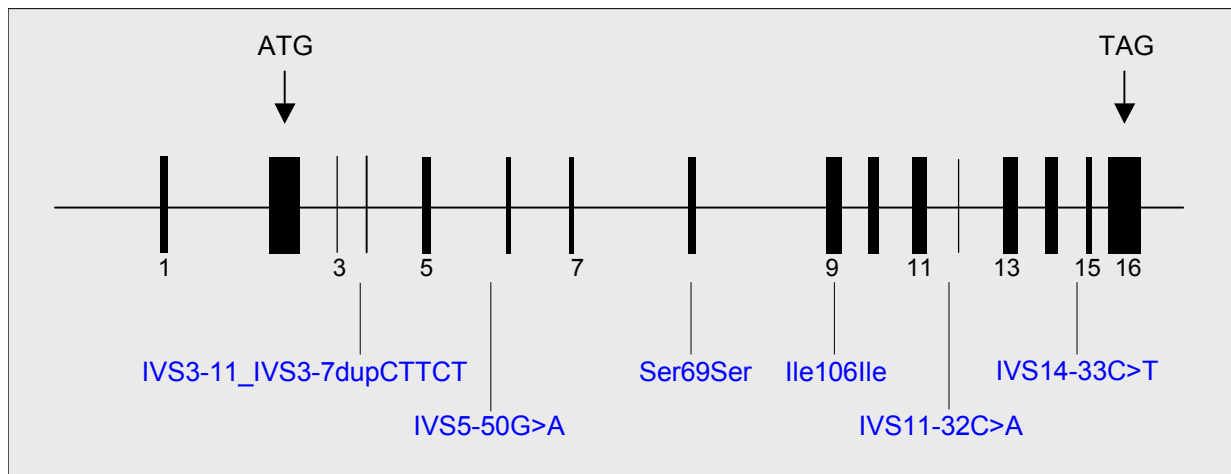


Abbildung 3-19: Lokalisation der Polymorphismen im Troponin T-Gen

Schematische Darstellung des Troponin T-Gens. Die senkrechten Balken repräsentieren die Exone, die Zwischenräume die Introne. Die Nummerierung der Exone ist nach GenBank Accession Number AY044273.1 angegeben. ATG und TAG sind Start- und Stoppkodons der Translation.

3.3.1 Polymorphismen

3.3.1.1 IVS3-11_IVS3-7dupCTTCT (g.6361_6365dupCTTCT)

Bei der SSCP-Analyse (Raumtemperatur und 4° C) von Exon 3 und 4 waren bei den 46 Patienten drei unterschiedliche Laufmuster vorhanden (Abb. 20A). Die DNA-Sequenzierung ergab einen Polymorphismus mit einer Duplikation der fünf Nukleotide CTTCT an den Nukleotidpositionen g.6361 bis g.6365 (Abb. 3-21).

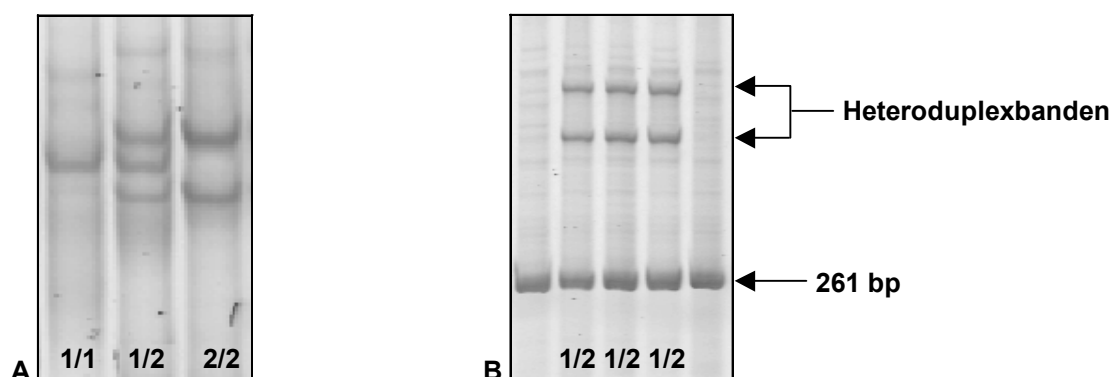


Abbildung 3-20: Variante IVS3-11_IVS3-7dupCTTCT (g.6361_6365dupCTTCT)

A) In der SSCP-Analyse bei 4° C sind die unterschiedlichen Bandenmuster der drei Genotypen deutlich erkennbar. 1/1: keine Duplikation, 1/2: Duplikation in einem Allel, 2/2: Duplikation in beiden Allelen. **B)** Anhand einer Heteroduplexanalyse wurden die heterozygoten Merkmalsträger anhand der zusätzlichen Heteroduplexbanden identifiziert.

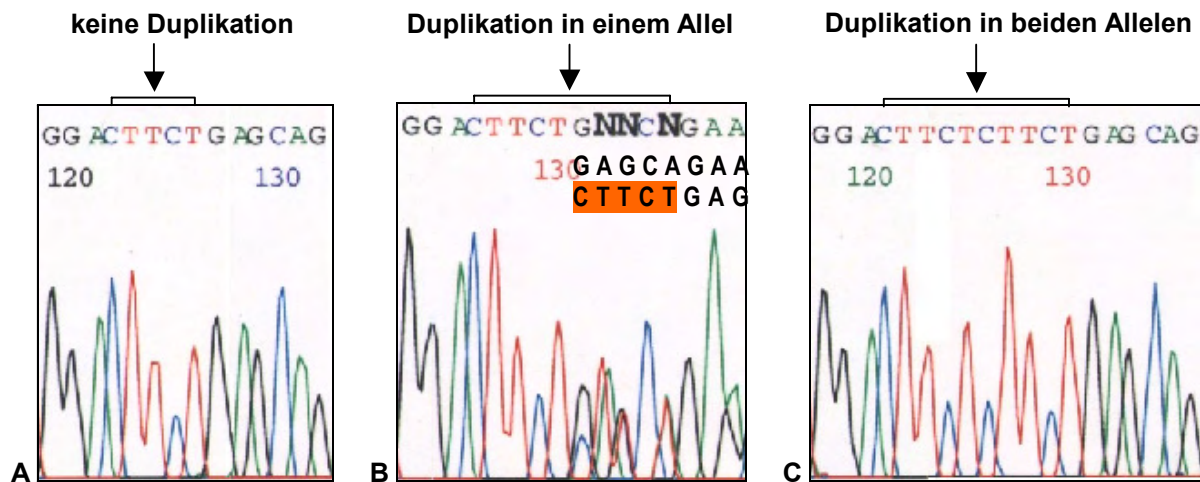


Abbildung 3-21: DNA-Sequenzierung der Variante IVS3-11_IVS3-7dupCTTCT

Die Sequenzierung identifizierte einen Polymorphismus mit einer Duplikation von fünf Basen. **A)** Der homozygote Wildtyp zeigt keine Duplikation. **B)** Der heterozygote Genotyp zeigt die Duplikation in nur einem Allel. In der Sequenzierung überlagern sich die beiden Allele, zur Verdeutlichung wurden die beiden Allelsequenzen nachträglich getrennt eingetragen. **C)** Die homozygote Mutante zeigt die Duplikation in beiden Allelen.

Die Variante liegt nicht im Bereich einer Erkennungssequenz für ein Restriktionsenzym, so dass zur Bestätigung des Polymorphismus eine Heteroduplexanalyse durchgeführt wurde. Hier konnten bei allen heterozygoten Merkmalsträgern die Heteroduplexbanden nachgewiesen werden (Abb. 3-20B). Die Bestimmung der Genotypen erfolgte anhand des SSCP-Gels bei 4° C.

3.3.1.2 IVS5-50G>A (g.10553G>A)

Die SSCP-Analyse von Exon 6 zeigte die in Abbildung 3-22 dargestellten drei verschiedenen Laufmuster. Dieser Polymorphismus konnte durch die DNA-Sequenzierung näher charakterisiert werden (Abb. 3-23). Es war die Transition G>A an Nukleotidposition g.10553 in Intron 5 ablesbar.

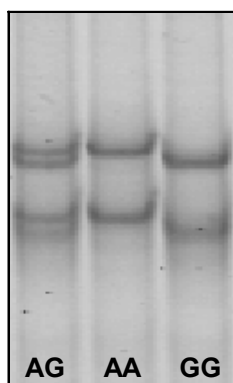


Abbildung 3-22: Variante IVS5-50G>A (g.10553G>A)

In der SSCP-Analyse bei 4° C sind die verschiedenen Bandenmuster der Genotypen deutlich sichtbar.

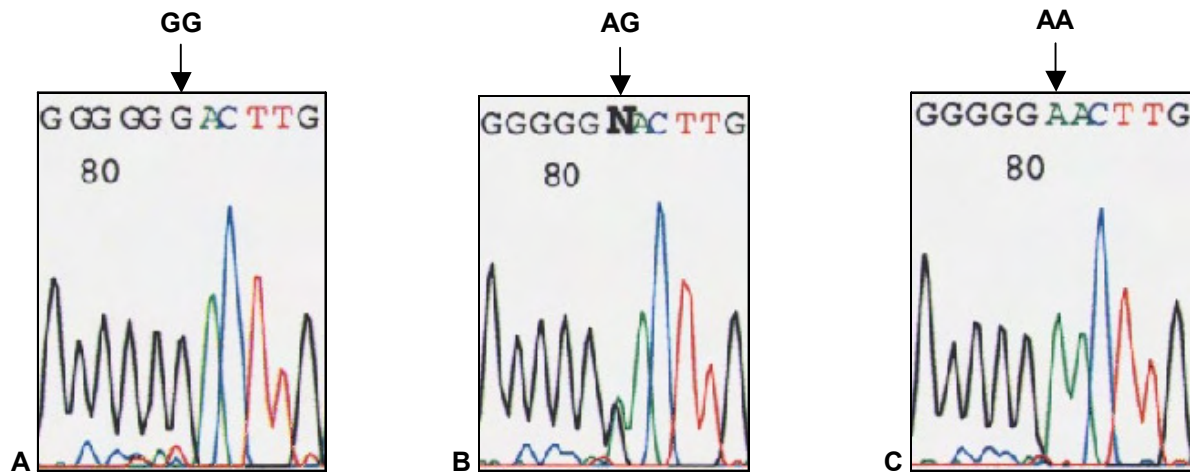


Abbildung 3-23: DNA-Sequenzierung der Variante IVS5-50G>A (g.10553G>A)

Die Sequenzierung bestätigte den Polymorphismus: **A)** Wildtyp homozygot (GG), **B)** heterozygot (AG) und **C)** Mutante homozygot (AA).

Da kein passendes Restriktionsenzym zur RFLP-Analyse vorhanden war, wurde der Polymorphismus durch mehrmalige unabhängige Sequenzierung ausgewählter Proben bestätigt. Die Genotypisierung wurde mittels des gut auswertbaren SSCP-Gels bei 4° C durchgeführt.

3.3.1.3 Ser69Ser (g.12739G>A)

In der SSCP-Analyse von Exon 8 wurde bei 11 Patienten eine Laufmusterabweichung beobachtet. Diese war bei Raumtemperatur besser sichtbar als bei 4° C (Abb. 3-24A).

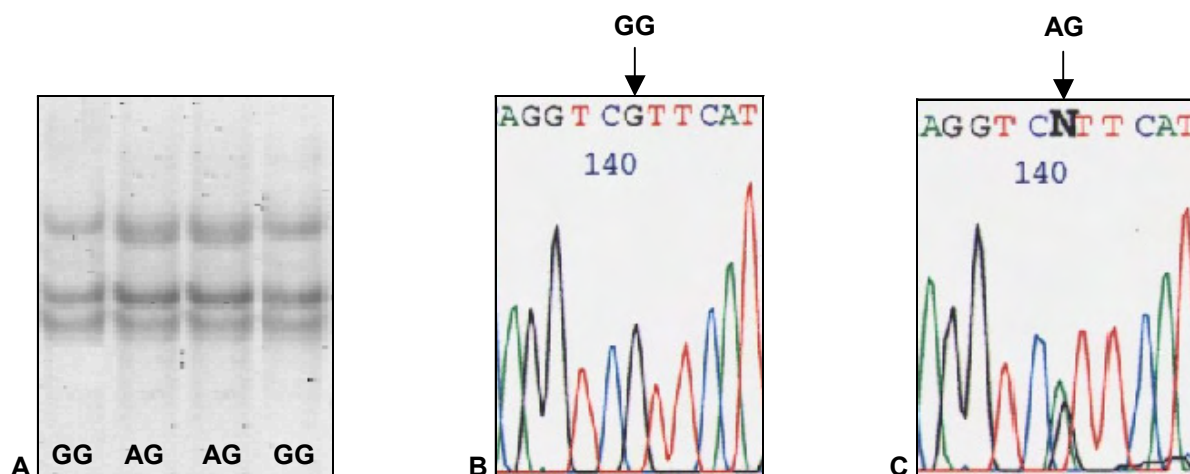


Abbildung 3-24: Variante Ser69Ser (g.12739G>A)

A) SSCP-Analyse bei Raumtemperatur. In den beiden mittleren Spuren fällt ein abweichendes Laufmuster auf. Die DNA-Sequenzierung bestätigte den Polymorphismus: **B)** Wildtyp homozygot (GG) und **C)** heterozygot (AG).

Die DNA-Sequenzierung zeigte eine Nukleotidsubstitution G>A an Position g.12739. Dadurch wird an Kodon-Position 69 TCG gegen TCA ausgetauscht (Abb. 3-24B/C), beide Triplets kodieren für die Aminosäure Serin.

Der Polymorphismus wurde durch mehrmaliges Sequenzieren einzelner PCR-Fragmente bestätigt, da die Variante nicht im Bereich eines Restriktionsenzym liegt. Alle 46 Patienten wurden anhand der SSCP-Analyse bei Raumtemperatur genotypisiert.

3.3.1.4 Ile106Ile (g.13150T>C)

Die SSCP-Analyse von Exon 9 zeigte sowohl bei Raumtemperatur als auch bei 4° C drei verschiedene Laufmuster (Abb. 3-25A). Durch die DNA-Sequenzierung ausgewählter Proben wurde eine T>C Transition an Position g.13150 identifiziert (Abb. 3-26). Die Aminosäure Isoleucin an Kodon-Position 106 bleibt erhalten, ATT wird zu ATC.

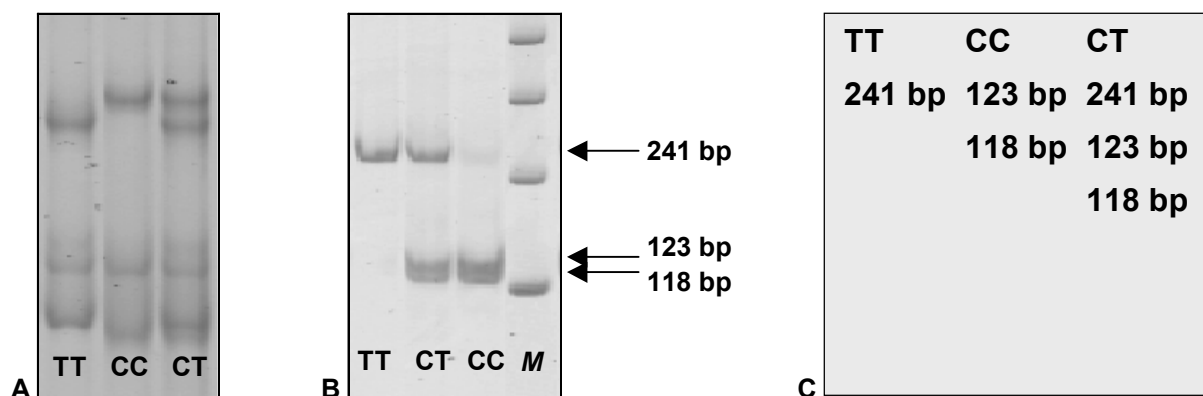


Abbildung 3-25: Variante Ile106Ile (g.13150T>C)

A) In der SSCP-Analyse bei 4° C zeigen die drei Genotypen deutlich ein unterschiedliches Laufverhalten. **B)** Durch die gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte von Exon 9 nach enzymatischer Spaltung mit Taq I wurde der Polymorphismus bestätigt, M = 100 bp-DNA-Ladder. **C)** Dargestellt sind die erwarteten Restriktionsfragment-Längen der Genotypen.

Durch die Nukleotidsubstitution T>C entsteht eine Schnittstelle für das Restriktionsenzym Taq I (t/cga). Die PCR mit den Primern Troponin T-Exon 9 F/R ergibt ein Amplifikat mit der Länge von 241 Basenpaaren. Werden diese Amplifikate mit der Restriktionsendonuklease Taq I verdaut, erhält man in Abhängigkeit vom Genotyp für jedes Allel charakteristische Restriktionsfragmente (Abb. 3-25C).

Die Genotypisierung erfolgte nach der elektrophoretischen Auftrennung dieser Fragmente in einem 10 %igem Polyacrylamidgel (Abb. 3-25B).

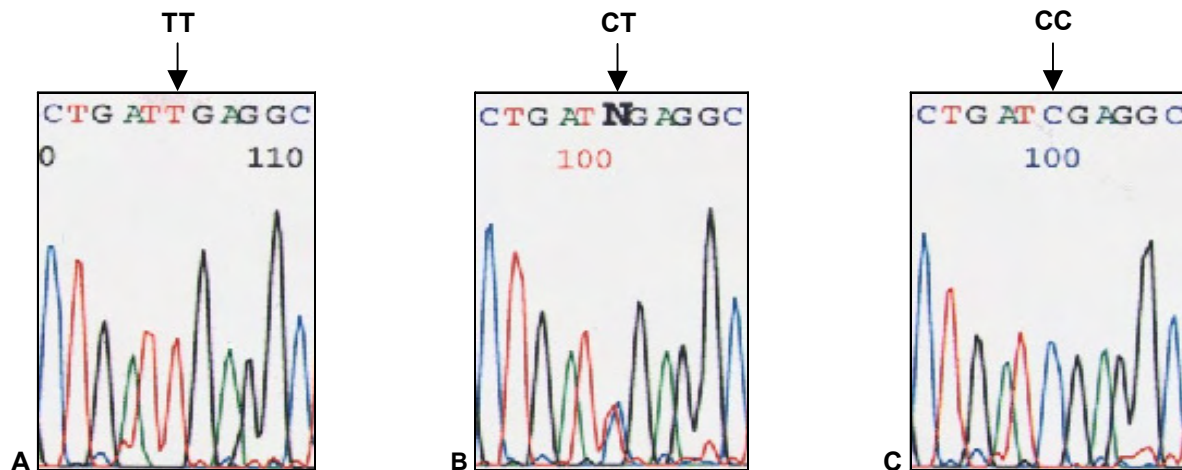


Abbildung 3-26: DNA-Sequenzierung der Variante Ile106Ile (g.13150T>C)

In den drei Sequenzierungsausschnitten sind die drei Genotypen sichtbar: **A)** Wildtyp homozygot (TT), **B)** heterozygot (CT) und **C)** Mutante homozygot (CC).

3.3.1.5 IVS11-32C>A (g.15978C>A)

Die SSCP-Analyse von Exon 12 lieferte einen Polymorphismus mit drei unterschiedlichen Bandenmustern. Diese waren sowohl bei Raumtemperatur als auch bei 4° C gut sichtbar (Abb. 3-27).

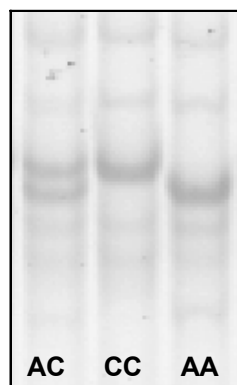


Abbildung 3-27: Variante IVS11-32C>A (g.15978C>A)

SSCP-Analyse bei 4° C. Die drei Spuren zeigen die verschiedenen Laufmuster der drei Genotypen.

Die DNA-Sequenzierung ergab die in Abbildung 3-28 gezeigte Transversion C>A in Intron 11 an Nukleotidposition g.15978.

Da durch die Variante keine Schnittstelle entsteht oder zerstört wird, konnte keine RFLP-Analyse etabliert werden. Zur Genotypisierung des DCM-Kollektivs diente das sehr gut auswertbare SSCP-Gel bei 4° C.

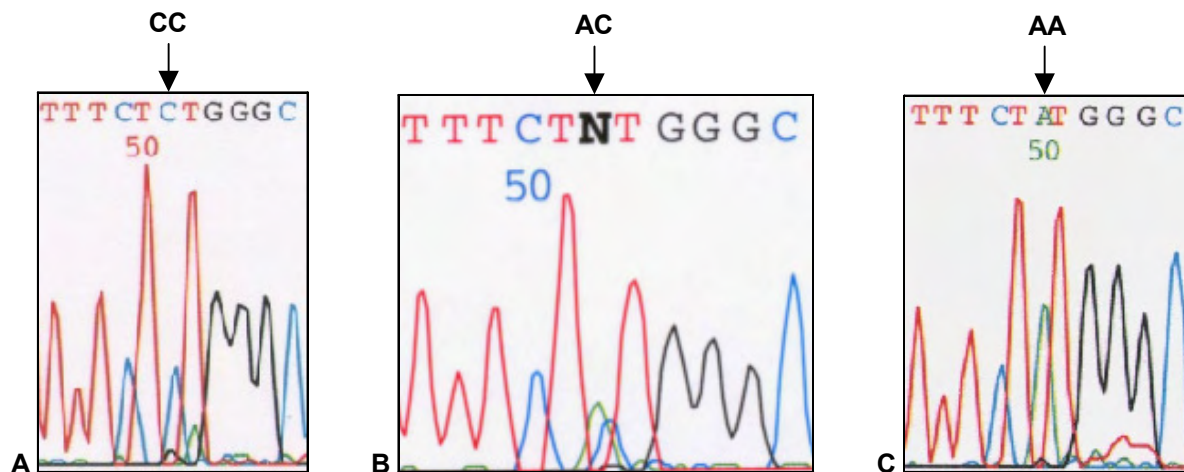


Abbildung 3-28: DNA-Sequenzierung der Variante IVS11-32C>A (g.15978C>A)

Die Pfeile kennzeichnen die drei unterschiedlichen Genotypen: **A)** Wildtyp homozygot (CC), **B)** heterozygot (AC) und **C)** Mutante homozygot (AA).

3.3.1.6 IVS14-33C>T (g.18708C>T)

Die SSCP-Analyse von Exon 15 zeigte bei zwölf Patienten die in Abbildung 3-29A dargestellte Laufmusterabweichung. Durch die DNA-Sequenzierung wurde eine Nukleotidsubstitution in Intron 14 an Position g.18708 identifiziert (Abb. 3-29B/C).

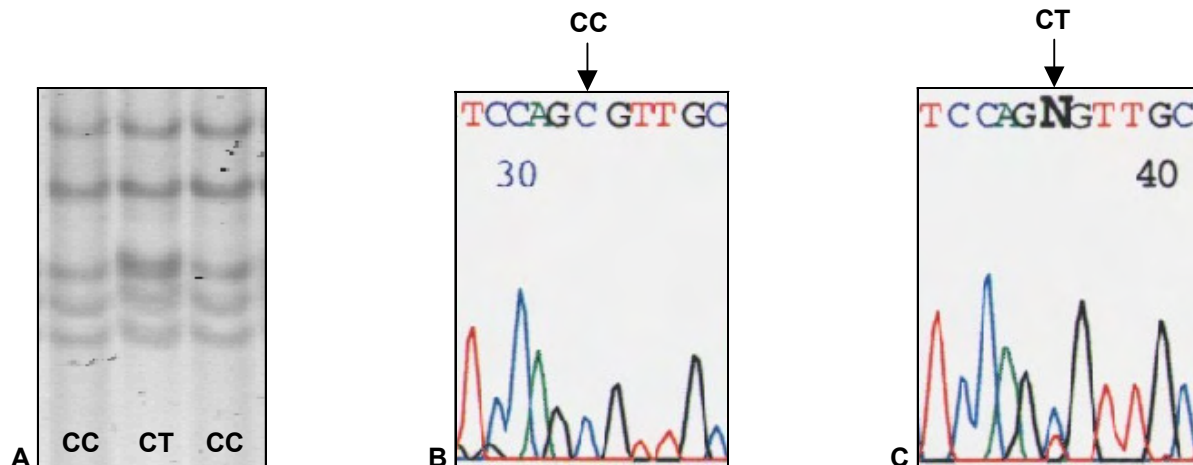


Abbildung 3-29: Variante IVS14-33C>T (g.18708C>T)

A) Die SSCP-Analyse bei Raumtemperatur zeigte ein aberrantes Bandenmuster (mittlere Spur). Die DNA-Sequenzierung bestätigte den Polymorphismus: **B)** Wildtyp homozygot (CC) und **C)** heterozygot (CT).

Durch die Nukleotidsubstitution C>T entsteht eine Schnittstelle für das Restriktionsenzym TspR I (nncagtgnn). Die PCR mit den Primern Troponin T-Exon 15 F/R produziert ein Fragment von 195 Basenpaaren. Da der homozygote Wildtyp keine Schnittstelle für TspR I hat, behält er in der Gelelektrophorese die volle PCR-Länge.

Der heterozygote Genotyp zeigte zusätzlich zwei Banden von 131 bp und 64 bp. Die homozygote Mutante war im DCM-Kollektiv nicht vorhanden. Die Genotypenbestimmung erfolgte anhand der gelelektrophoretischen Auftrennung der verdauten Fragmente (Abb. 3-30A).

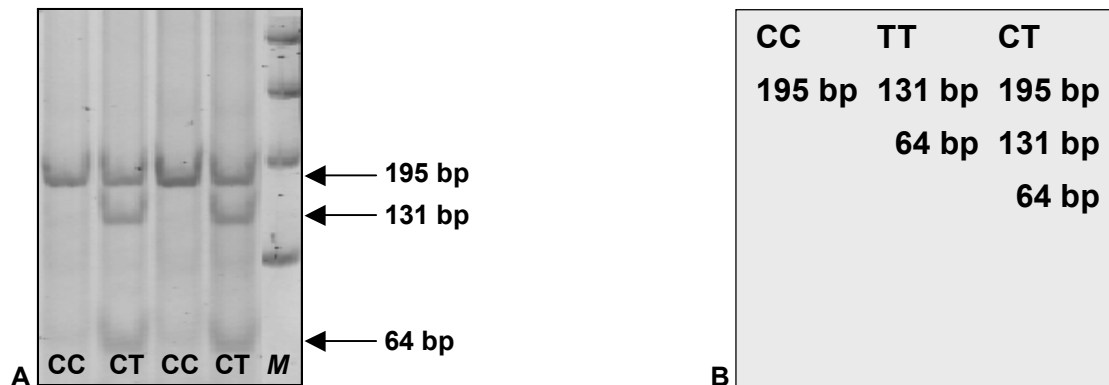


Abbildung 3-30: RFLP-Analyse der Variante IVS14-33C>T (g.18708C>T)

A) Der Polymorphismus konnte durch eine RFLP-Analyse mit TspR I nach gelelektrophoretischer Auftrennung der PCR-Produkte zusätzlich bestätigt werden, M = 100 bp-DNA-Ladder. **B)** Das Schaubild zeigt die erwarteten Restriktionsfragment-Längen der drei möglichen Genotypen.

3.3.2 Statistische Auswertung der Polymorphismen im Troponin T-Gen

Die sechs identifizierten Polymorphismen im Troponin T-Gen wurden mit Hilfe des Chi²-Tests statistisch analysiert, um ein Abweichen der Genotypen des Kollektivs vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht zu überprüfen (Tab. 3-6).

Bei allen Polymorphismen sind die p-Werte jeweils >0,05. Beobachtete und erwartete Häufigkeit weisen also keinen signifikanten Unterschied auf. Um zu überprüfen, ob ein Allel oder Genotyp bei DCM oder HCM bevorzugt auftritt, wurden die jeweiligen Allel- und Genotypfrequenzen mit denen eines HCM-Kollektivs bereits genotypisierter Patienten aus dem Deutschen Herzzentrum Berlin verglichen. Die Analyse mit Hilfe des Chi²-Unabhängigkeitstests bzw. des exakten Tests nach Fisher ergab auf dem Niveau von p = 0,05 keinen signifikanten Unterschied in der Allel- und Genotypfrequenz des jeweiligen Polymorphismus (Tab. 3-7).

Tabelle 3-6: Troponin T-Gen: Hardy-Weinberg-Gleichgewicht des DCM-Kollektivs (n = 46)

Variante	Allelfrequenz (%)	Beobachtete Häufigkeit	Erwartete Häufigkeit	p-Wert
IVS3-11_IVS3-7dupCTTCT (g.6361_6365dupCTTCT)	60 / 40	1/1: 17	1/1: 16,6	0,945
		1/2: 21	1/2: 22,1	
		2/2: 8	2/2: 7,4	
IVS5-50G>A (g.10553G>A)	63 / 37	GG: 17	GG: 18,3	0,713
		AG: 24	AG: 21,4	
		AA: 5	AA: 6,3	
Ser69Ser (g.12739G>A)	88 / 12	GG: 35	GG: 35,6	0,655
		AG: 11	AG: 9,7	
		AA: 0	AA: 0,662	
Ile106Ile (g.13150T>C)	73 / 27	TT: 23	TT: 24,5	0,568
		CT: 21	CT: 18,1	
		CC: 2	CC: 3,4	
IVS11-32C>A (g.15978C>A)	73 / 27	CC: 23	CC: 24,5	0,568
		AC: 21	AC: 18,1	
		AA: 2	AA: 3,4	
IVS14-33C>T (g.18708C>T)	87 / 13	CC: 34	CC: 34,8	0,594
		CT: 12	CT: 10,4	
		TT: 0	TT: 0,777	

Gegenüberstellung der in dieser Arbeit beobachteten und nach dem Hardy-Weinberg-Gleichgewicht erwarteten Häufigkeiten. Der Chi²-Test zeigt jeweils keinen signifikanten Unterschied.

Tabelle 3-7: Troponin T-Gen: Vergleich der Allel- und Genotypfrequenzen bei DCM und HCM

Variante	Allelfrequenz			Genotypfrequenz				
	Allel	DCM % (n)	HCM % (n)	p-Wert	Genotyp	DCM % (n)	HCM % (n)	p-Wert
IVS3-11_IVS3-7 dupCTTCT	1:	60 % (55)	65 % (131)	0,403	1/1:	37 % (17)	44 % (44)	0,717
	2:	40 % (37)	35 % (71)		1/2:	46 % (21)	43 % (43)	
	(1 = nicht dupliziert, 2 = dupliziert)				2/2:	17 % (8)	14 % (14)	
IVS5-50G>A (g.10553G>A)	G:	63 % (58)	51 % (102)	0,059*	GG:	37 % (17)	24 % (24)	0,134
	A:	37 % (34)	49 % (98)		AG:	52 % (24)	54 % (54)	
					AA:	11 % (5)	22 % (22)	
Ser69Ser (g.12739G>A)	G:	88 % (81)	86 % (173)	0,578	GG:	76 % (35)	73 % (74)	0,621
	A:	12 % (11)	14 % (29)		AG:	24 % (11)	25 % (25)	
					AA:	0 % (0)	2 % (2)	
Ile106Ile (g.13150T>C)	T:	73 % (67)	74 % (150)	0,899	TT:	50 % (23)	54 % (55)	0,690
	C:	27 % (25)	26 % (54)		CT:	46 % (21)	39 % (40)	
					CC:	4 % (2)	7 % (7)	
IVS11-32C>A (g.15978C>A)	C:	73 % (67)	69 % (108)	0,548	CC:	50 % (23)	47 % (37)	0,631
	A:	27 % (25)	31 % (48)		AC:	46 % (21)	44 % (34)	
					AA:	4 % (2)	9 % (7)	
IVS14-33C>T (g.18708C>T)	C:	87 % (80)	93 % (190)	0,118*	CC:	74 % (34)	86 % (88)	0,100*
	T:	13 % (12)	7 % (14)		CT:	26 % (12)	14 % (14)	
					TT:	0 % (0)	0 % (0)	

Die statistische Analyse der Allel- und Genotypfrequenzen zeigt keinen signifikanten Unterschied zwischen dem DCM-Kollektiv und einem HCM-Kollektiv. * Fisher's exakter Test

4 Diskussion

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurde bei 46 nicht verwandten Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie eine systematische Mutationssuche in den Sarkomerprotein-Genen für β -MHC und Troponin T durchgeführt. Insgesamt wurden im β -MHC-Gen zehn Varianten identifiziert. Es wurden zwei Mutationen mit Aminosäureaustausch ermittelt, und zwar die Missense-Mutationen Ala223Thr (g.7799G>A) und Ser642Leu (g.12164C>T). Beide Mutationen sind bisher nicht beschrieben worden. Des Weiteren fanden sich zwei seltene genetische Varianten mit unklarer funktioneller Relevanz und sechs Polymorphismen, die in ihrer Allel- und Genotypfrequenz mit einem Kontrollkollektiv bereits genotypisierter HCM-Patienten aus der DNA-Datenbank des Deutschen Herzzentrums Berlin verglichen wurden [99].

Im Troponin T-Gen wurden keine Mutationen gefunden. Die Analyse zeigte sechs Polymorphismen, als Kontrollkollektiv dienten ebenfalls bereits genotypisierte HCM-Patienten [99].

4.1 Bewertung des Patientenkollektivs und der Methoden

Alle 46 Patienten erfüllten die Diagnosekriterien für DCM der Europäischen Arbeitsgruppe über familiäre Kardiomyopathien (Collaborative Research Group of the European Human and Capital Mobility Project on Familial Dilated Cardiomyopathy) [18]. Der LVEDD war größer als 117 % des für das Alter und für die Körperoberfläche entsprechenden Normwertes, und bei allen Patienten waren die LVEF kleiner als 45 % und/oder die VF kleiner als 25 %. Es wurden überwiegend junge Patienten in die Studie aufgenommen, um andere Ursachen für eine Dilatation des Herzens gering zu halten. Da mehrere Arbeitsgruppen von einem Übergang von HCM zu DCM berichten [100, 101], wurden bei allen Patienten die typischen Merkmale einer HCM ausgeschlossen. Echokardiographisch war keine asymmetrische Hypertrophie des Kammerseptums und der linksventrikulären Hinterwand messbar, und die Myokardbiopsie zeigte keinen Verlust der regelmäßigen parallelen Anordnung der Myozyten (disarray) [4].

Zum Nachweis von unbekanntem Mutationen steht eine Vielzahl von Techniken zur Verfügung [90]. Das von uns gewählte PCR-SSCP-Detektionsverfahren hat den entscheidenden Vorteil, dass eine große Anzahl von Personen und große DNA-Bereiche schnell auf genetische Varianten mit vertretbarem Material- und Etablierungsaufwand untersucht werden können. Dies wäre durch andere Methoden mit einem

vergleichbaren Aufwand nicht zu erreichen. Der Nachteil der SSCP-Analyse ist, dass verschiedene Arbeitsgruppen die Sensitivität nur zwischen 70 und 90 % angeben, so dass Mutationen übersehen werden können [87, 88]. Jedoch kann die Sensitivität bei einer DNA-Fragmentlänge von 150 bis 300 bp und optimalen Elektrophorese-Bedingungen angehoben werden [89, 91]. Deshalb wurde in dieser Arbeit die Analyse bei zwei unterschiedlichen Temperaturen durchgeführt – Raumtemperatur und 4° C. Außerdem optimierten wir die Acrylamidkonzentration und Ionenstärke des Laufpuffers, um die Detektionsrate zu erhöhen.

Weiterhin wurde in unserer Arbeitsgruppe ein Patientenkollektiv mit HCM auf Mutationen im β -MHC-Gen sowohl mit der etablierten SSCP-Methode als auch mit der Temperatur-modulierten Heteroduplexanalyse (TMHA) untersucht, um die Sensitivität beider Methoden zu vergleichen [102]. Es zeigte sich, dass unsere SSCP-Methode im Vergleich zur TMHA eine Sensitivität von 92 % besitzt, diese Mutationsdetektionsrate liegt im oberen Bereich von veröffentlichten SSCP-Sensitivitätsraten [103, 104]. Es ist also nahezu ausgeschlossen, dass Genvarianten bei den untersuchten Patienten übersehen wurden.

Um Sequenzabweichungen zu ermitteln wurden die auffälligen Proben sequenziert. Als zusätzliche Bestätigung der Varianten wurde entweder eine Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismen-Analyse, eine Heteroduplexanalyse oder eine erneute Sequenzierung eines unabhängigen PCR-Produkts angewandt.

4.2 Bedeutung von seltenen genetischen Varianten und Polymorphismen

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurden neben zwei Missense-Mutationen zwei Mutationen ohne Aminosäureaustausch im β -MHC-Gen und jeweils sechs Polymorphismen im β -MHC- und im Troponin T-Gen identifiziert. Die Bedeutung von synonymen Varianten, die nicht zu einem Aminosäureaustausch führen, ist schwer abzuschätzen. Üblicherweise gelten sie als bedeutungslos. Durch die Veränderung der Nukleotidsequenz und damit der RNA-Sekundärstruktur besteht jedoch die Möglichkeit, dass Transkription, Processing und Translation beeinflusst werden.

Das Processing überführt die transkribierte, unreife prä-mRNA in die reife mRNA, die dann der Translation zur Verfügung steht. Sie umfasst die drei Reifungsschritte Capping, Polyadenylierung und Spleißen. Die meisten Krankheiten, die durch Veränderung des Processings entstehen, beruhen auf Defekten während des Spleißens der prä-mRNA [105]. Für korrektes Spleißen werden RNA-Erkennungssequenzen

benötigt, die am Intron-Exon-Übergang (Spleißdonor/-akzeptor) und innerhalb des Introns (Verzweigungspunkt) liegen. Mutationen, die solche Erkennungssequenzen zerstören, führen zu einem aberranten Spleißen. Es wird geschätzt, dass 15 % aller pathologischen Mutationen zu Spleißdefekten der betroffenen Gene führen [106].

Um den Einfluss der intronischen Variante IVS2-25G>T im β -MHC-Gen und der fünf intronischen Polymorphismen auf das Spleißen vorhersagen zu können, wurden die veränderten Sequenzen mit dem Splice-Site-Prediction-Tool des Berkeley Drosophila Genome Project analysiert [107]. Es zeigte sich, dass alle sechs intronischen Varianten außerhalb von Spleiß-Konsensus-Sequenzen liegen, so dass ein Einfluss auf das Spleißen der prä-mRNA unwahrscheinlich ist. Vermutlich haben diese Varianten also keine funktionelle Bedeutung.

Bei der Translation wird die genetische Information in Protein umgesetzt. Jeweils drei Nukleotide (Triplet) sind einer Aminosäure zugeordnet, eine Aminosäure kann jedoch von verschiedenen Triplets kodiert werden, die sich nur in der dritten Stelle unterscheiden. Diese Triplets oder Kodons werden als synonym bezeichnet. Bei einer Nukleotidsubstitution an der dritten Position des Triplets kann das veränderte Kodon eine seltenere tRNA verlangen, und dadurch zu einer Veränderung der Translationseffizienz führen. Grantham et al. zeigten, dass die Verwendung synonymen Kodons nicht zufällig ist, sondern dass bestimmte Kodons spezies-spezifisch bevorzugt werden [108]. Hierfür wurde der Begriff „codon usage bias“ geprägt. Durch die selektive Verwendung synonymen Kodons soll für die jeweilige Spezies ein Selektionsvorteil entstehen, der durch die erhöhte Translationseffizienz erklärt wird [109, 110].

Von den zwölf identifizierten Polymorphismen befinden sich sieben in den kodierenden Bereichen der beiden Gene, außerdem fand sich eine synonyme Mutation Asp376Asp im β -MHC-Gen. Anhand der Datenbank des Kazusa DNA Research Institute wurde analysiert, ob jeweils eine Bevorzugung eines der beiden Kodons vorliegt (Tab. 4-1) [111]. Bei den Polymorphismen Phe244Phe, Asp325Asp, Lys365Lys und Ile106Ile besteht nur ein geringer Unterschied in der Häufigkeit, mit der das jeweilige synonyme Kodon eingebaut wird. Es wird also nicht eindeutig ein bestimmtes Kodon bevorzugt. Bei den Varianten Thr63Thr, Gly354Gly und Ser69Ser besteht ein stärkerer Unterschied in der Häufigkeit der verwendeten Kodons, was für einen Selektionsvorteil spricht. Wie groß der Einfluss auf die Translationseffizienz tatsächlich ist und inwieweit dies zur Krankheitsentstehung beiträgt, kann aufgrund dieser Werte jedoch kaum abgeschätzt werden.

Tabelle 4-1: Codon usage der stummen Varianten im β -MHC- und Troponin T-Gen

Gen	Variante	Kodon	Codon usage	Häufigkeit / 1.000 Kodons	Anzahl der unter- suchten Kodons
MYH7	Asp376Asp	GAC	54 %	25,5	765.702
		GAT	46 %	21,9	656.552
	Thr63Thr	ACC	60 %	19,2	574.769
		ACT	40 %	13,0	389.477
	Phe244Phe	TTC	55 %	20,5	613.217
		TTT	45 %	17,1	512.809
	Asp325Asp	GAC	54 %	25,5	765.702
		GAT	46 %	21,9	656.552
	Gly354Gly	GGC	68 %	22,6	678.626
		GGT	32 %	10,8	323.268
Lys365Lys	AAG	57 %	32,2	965.496	
	AAA	43 %	23,9	717.175	
TNNT2	Ser69Ser	TCG	27 %	4,5	134.506
		TCA	73 %	12,0	358.579
	Ile106Ile	ATT	43 %	15,8	472.168
		ATC	57 %	21,1	633.572

Codon usage zeigt an, zu welchem Anteil das spezifische Kodon im Vergleich zu seiner synonymen Variante verwendet wird. Außerdem ist angegeben, wie häufig das jeweilige Kodon innerhalb von 1.000 Kodons beobachtet wurde, und wie viele Kodons insgesamt untersucht wurden.

Die synonyme Mutation Asp376Asp im β -MHC-Gen führt zu einem Austausch des Kodons GAC zu GAT. Beim Menschen ist GAC mit einer Häufigkeit von 54 %, GAT mit 46 % vertreten. Es besteht also keine eindeutige Bevorzugung eines der beiden Triplets, so dass eine Veränderung der Translationseffizienz unwahrscheinlich erscheint.

Auffällig ist, dass die Mutation bei dem gleichen Patienten auftrat, der die Mutation Ala223Thr trägt. Inwieweit die synonyme Mutation zur Beeinträchtigung der Proteinfunktion bei diesem Patienten beiträgt, ist unklar. Obwohl es primär nicht zu einer Veränderung der Aminosäuresequenz kommt, ist denkbar, dass durch die Nukleotidsubstitution C>T an Position g.9666 ein fakultatives Spleißsignal innerhalb des Exons (Spleiß-Enhancer) zerstört wird. Solche Spleiß-Enhancer-Mutationen sind unter anderem bei der Neurofibromatose Typ 1 oder der spinalen Muskelatrophie beschrieben, bei der eine synonyme Mutation in Exon 7 zu einem alternativen Spleißprodukt führt und so die Krankheit verursacht [112, 113].

Kürzlich berichtete eine Arbeitsgruppe aus Japan ebenfalls von der Mutation

Asp376Asp in einem Patientenkollektiv von 99 nicht verwandten DCM-Patienten [114]. Da die Mutation nicht zu einem Aminosäureaustausch führt, wurde sie jedoch in dieser Veröffentlichung nicht diskutiert.

In der statistischen Analyse der in der vorliegenden Arbeit identifizierten zwölf Polymorphismen wurden die jeweilige beobachtete Genotypverteilung im DCM-Patientenkollektiv mit nach dem Hardy-Weinberg-Gesetz errechneten Werten verglichen. Diese Analyse ergab keinen signifikanten Unterschied in der Verteilung der Genotypen ($p > 0,05$).

Da die Polymorphismen auch bei HCM beschrieben wurden [99], haben wir für die weitere statistische Analyse HCM-Patienten hinzugezogen, die bereits in elf der zwölf beschriebenen Polymorphismen genotypisiert waren. Um zu testen, ob ein Allel oder Genotyp bei DCM im Vergleich zu HCM gehäuft auftritt, haben wir die jeweiligen Allel- und Genotypfrequenzen der Polymorphismen verglichen. Es konnte jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen DCM und HCM nachgewiesen werden. Es tritt also mit hoher Wahrscheinlichkeit weder bei DCM noch bei HCM ein bestimmtes Allel oder ein bestimmter Genotyp bevorzugt auf. Eine direkte pathogenetische Relevanz der Polymorphismen erscheint daher unwahrscheinlich.

Da sich im Rahmen unserer Fragestellung keine Anhaltspunkte auf eine krankheitsverursachende Rolle der zwölf Polymorphismen ergab, wurden keine weiteren funktionellen Untersuchungen durchgeführt.

4.3 Genotyp-Phänotyp-Korrelation

Die Genotyp-Phänotyp-Korrelation beschreibt, ob ein Zusammenhang zwischen molekulargenetischen und klinischen Befunden besteht, ob also bestimmte Mutationen in bestimmten Genen für einen bestimmten Phänotyp prädisponieren. Der Phänotyp kann durch mehrere Merkmale charakterisiert werden: durch die Penetranz der Erkrankung bzw. das Alter bei Krankheitsbeginn, durch den Schweregrad und Verlauf der Erkrankung und durch einen zusätzlichen Phänotyp neben der Grunderkrankung.

Die dilatative Kardiomyopathie wird sowohl durch Mutationen in Genen für das Sarkomer als auch für das Zytoskelett verursacht. Dabei treten teilweise zusätzliche Phänotypen auf. Einerseits sind dies kardiale Manifestationen, z. B. Störungen des Erregungsleitungssystems bei Mutationen im Lamin A/C-Gen oder ein Mitralklappenprolaps bei Mutationen im Locus 10q21-23 [30, 37]. Die DCM kann aber auch von

extrakardialen Störungen wie Skelettmuskelmyopathien (Dystrophin, Desmin, Tafazzin) [33, 35, 80] oder Innenohrschwerhörigkeit (EYA4) [81] begleitet sein. Bei allen bisher bekannten Mutationen in Sarkomerprotein-Genen bei DCM-Patienten trat jedoch keiner dieser zusätzlichen Phänotypen auf. Auch die zwei Patienten dieser Studie, die Träger der beiden Mutationen im β -MHC-Gen sind, leiden an einer isolierten dilatativen Kardiomyopathie.

Als Penetranz wird bei einer Erbkrankheit die Tendenz zur Ausprägung von typischen Symptomen bezeichnet. Sie ist bei der DCM altersabhängig und dabei sehr variabel. Familienmitglieder mit der gleichen Mutation können bereits als Kind oder erst sehr viel später im Erwachsenenalter erkranken. Da bei beiden Indexpatienten keine Familienmitglieder zur genetischen Untersuchung bereit standen, ist es schwierig, Aussagen über die Penetranz der beiden Mutationen zu machen. Es zeigte sich lediglich ein Unterschied im Erkrankungsbeginn. Der Indexpatient mit der Mutation Ser642Leu erkrankte bereits mit 18 Jahren an einer DCM, der Patient mit der Mutation Ala223Thr erst mit 35 Jahren. Wie bei vielen monogen vererbten Erkrankungen hängt die phänotypische Ausprägung der Erkrankung wohl von weiteren Faktoren ab. Dies können genetische Faktoren, wie Modifier Genes, aber auch nicht-genetische Faktoren, wie Umweltfaktoren, Autoantikörper oder hämodynamische Veränderungen sein [115, 116]. Diese Faktoren tragen ebenfalls zur Schwere der Erkrankung bei.

Bei der hypertrophen Kardiomyopathie konnte gezeigt werden, dass Mutationen in verschiedenen Sarkomerprotein-Genen einen unterschiedlichen Schweregrad und Verlauf der Erkrankung hervorrufen können. So führen Mutationen im Troponin T-Gen zwar nur zu einer milden Hypertrophie, sind aber mit einem hohen Risiko für den plötzlichen Herztod assoziiert [62]. Mutationen im β -MHC-Gen sind überwiegend mit einem schweren Krankheitsverlauf verbunden [117]. Dahingegen führen Mutationen im Myosin-Bindungsprotein C-Gen eher zu einem milden Verlauf [118].

Um bei der dilatativen Kardiomyopathie Aussagen über Schweregrad und Krankheitsverlauf bei Vorliegen von einzelnen Mutationen in den verschiedenen Sarkomerprotein-Genen treffen zu können, sind bisher noch zu wenige Familien untersucht worden. Mogensen et. al. identifizierten in fünf Familien vier Mutationen im Troponin T-Gen und eine Mutation im Troponin C-Gen [69]. Insgesamt lag ein maligner Verlauf vor, denn 15 von 21 Mutationsträgern (71 %) verstarben am plötzlichen Herztod oder erhielten eine Herztransplantation. Auch die beiden bereits bekannten Mutationen im β -MHC-Gen,

Ser532Pro und Phe764Leu, führen zu einem eher schweren Krankheitsverlauf, auffällig ist hier insbesondere bei der Mutation Phe764Leu ein früher Krankheitsbeginn [48].

Der Indexpatient mit der Mutation Ser642Leu erkrankte bereits im Alter von 18 Jahren. Initial wurde er klinisch als NYHA III eingestuft und zur Transplantation akzeptiert. Aufgrund von ventrikulären Arrhythmien wurde ein ICD implantiert; ebenso bei dem Indexpatienten mit der Mutation Ala223Thr, der nach Kammerflimmern einen ICD erhielt. Die Erkrankung trat bei diesem Patienten erst in einem Alter von 35 Jahren auf. Bei beiden zeichnet sich insgesamt ein schwerer Krankheitsverlauf ab. Um jedoch genauere Aussagen zur Genotyp-Phänotyp-Korrelation bei DCM-assoziierten Mutationen machen zu können, sind Untersuchungen größerer Familien und im Tiermodell notwendig.

Bei den 46 nicht verwandten Patienten wurden neben den Genen für β -MHC und Troponin T, die in der vorliegenden Arbeit beschrieben sind, auch die Gene für Myosin-Bindungsprotein C und α -Tropomyosin analysiert. Die vier Gene wurden ausgewählt, da Mutationen in diesen Genen die häufigste Ursache für HCM sind [119]. Das Ziel war, erstens neue Mutationen in Sarkomerprotein-Genen bei DCM zu entdecken und zweitens ihre Häufigkeit in einem nicht verwandten Patientenkollektiv anzugeben.

Kamisago et al. untersuchten 20 Patienten mit familiärer DCM in den Genen für β -MHC, Troponin T, Troponin I und α -Tropomyosin [48]. Es wurde bei zwei Patienten eine Deletion im Troponin T-Gen gefunden, bei einem eine Missense-Mutation im β -MHC-Gen. Deshalb wurde die Häufigkeit von Mutationen in Sarkomerprotein-Genen bei Patienten mit familiärer DCM mit mindestens 10 % angegeben. Kürzlich identifizierten Villard et al. in einem Kollektiv von 96 nicht verwandten DCM-Patienten sowohl bei zwei Patienten die bereits bekannte Mutation Arg141Trp im Troponin T-Gen als auch sieben neue Mutationen im β -MHC-Gen [120]. Das Mutationsscreening umfasste neben dem β -MHC- und Troponin T-Gen auch die Gene für Phospholamban und Metavinculin, in denen keine Mutationen entdeckt wurden. Deshalb schreiben die Autoren dem β -MHC-Gen eine vorherrschende Rolle bei dilatativer Kardiomyopathie zu.

Wir haben neben den beiden bereits beschriebenen Mutationen im β -MHC-Gen im gleichen Patientenkollektiv eine weitere Mutation im Myosin-Bindungsprotein C-Gen identifiziert [64]. Die Häufigkeit von Mutationen in unserer Patientengruppe liegt also bei 6,5 % und somit niedriger als 10 %. Die Erklärung dafür könnte die Zusammensetzung des Patientenkollektivs sein. Unser Kollektiv bestand aus 46 nicht miteinander

verwandten symptomatisch erkrankten Patienten, Kamisago et al. akquirierten ihre 20 Patienten dahingegen aus 20 betroffenen Familien. Außerdem hatten bei Villard et al. die Träger von Mutationen im β -MHC-Gen bei Diagnosestellung bereits ein Alter von $48,2 \pm 17$ Jahren, die Autoren stellten somit einen späten Krankheitsbeginn bei Patienten mit Mutationen im β -MHC-Gen fest [120]. Da wir unsere 46 Patienten anhand eines frühen Alters bei Diagnosestellung ($29,5 \pm 7,9$ Jahre) auswählten, könnte demnach die Wahrscheinlichkeit geringer sein, DCM-Patienten mit Mutationen im β -MHC-Gen zu erfassen. Ein weiterer Grund für das seltenere Auftreten von Mutationen in unserem Kollektiv könnte darin bestehen, dass wir nur den Kopfteil des β -MHC untersucht haben. Vier der sieben Mutationen von Villard et al. sind im Schwanzteil lokalisiert [120].

4.4 Molekularbiologischer Krankheitsmechanismus

Das β -MHC-Gen und das Troponin T-Gen kodieren beide für Bestandteile des Sarkomers. Durch Mutationen kann es zu einem defekten, nicht funktionsfähigen Protein kommen, wodurch die Muskelkontraktion beeinflusst wird.

Bei Mutationen in autosomal-dominant vererbten Genen gibt es zwei verschiedene Pathomechanismen, die zu einer Veränderung der Proteinfunktion führen. Der eine Weg ist die Haploinsuffizienz [39]. Durch Deletions-, Insertionsmutationen und Mutationen im Bereich von Spleiß-Donor- und Spleiß-Akzeptor-Stellen, wie sie zum Beispiel im Troponin T- und vor allem im Myosin-Bindungsprotein C-Gen vorkommen, wird ein Allel inaktiviert, was zu weniger funktionstüchtigem Protein führt. Die Aktivität des normalen Allels reicht quantitativ nicht aus, um den Ausfall des mutierten Allels zu kompensieren. Die zweite Möglichkeit ist der dominant-negative Mechanismus [121]. Es wird ein mutiertes Protein gebildet, das mit der normalen Proteinfunktion interferiert oder eine neue Funktion hat. Die Wirkung des normalen Proteins wird aufgehoben.

Die überwiegende Zahl aller bisher beschriebenen Mutationen im kardialen β -MHC-Gen bei HCM und DCM sind Missense-Mutationen, die dominant-negative Effekte bewirken und nicht zu einem vorzeitigen Abbruch der Transkription führen [40, 41, 42].

Es stellt sich die Frage, wie der Austausch einer einzelnen Aminosäure die Krankheit verursachen kann und insbesondere, wann eine Mutation zu DCM, wann zu HCM führt. Dies soll im Folgenden anhand der gefundenen Mutationen im β -MHC-Gen bei DCM erörtert werden.

4.5 Phänotyp bei Mutationen in Sarkomerprotein-Genen

Eine effektive Muskelkontraktion erfordert die Krafterzeugung durch das Sarkomer und die Kraftübertragung durch Zytoskelett und extrazelluläre Matrix. Lange Zeit glaubte man, dass eine ineffektive Krafterzeugung zur hypertrophen Kardiomyopathie führt, Defizite in der Kraftübertragung hingegen in einer dilatativen Kardiomyopathie münden. Deshalb wurde die HCM als Erkrankung des Sarkomers und DCM als Erkrankung des Zytoskeletts bezeichnet [25, 47].

Mittlerweile konnte jedoch gezeigt werden, dass Mutationen in sieben Sarkomerprotein-Genen auch zu DCM führen können (Tab. 4-2). Die These, dass DCM ausschließlich eine Erkrankung des Zytoskeletts und HCM eine Erkrankung des Sarkomers ist, ist also nicht mehr haltbar. Ob dabei eine eindeutige Beziehung zwischen Genotyp und Phänotyp besteht, ob also die Position der Mutation im Molekül die Entwicklung einer HCM bzw. DCM bestimmt, ist bisher unklar. Es sind grundsätzlich zwei Mechanismen denkbar:

Die erste Möglichkeit ist, dass zwei unterschiedliche Pathomechanismen für DCM bzw. HCM verantwortlich sind. Dies würde bedeuten, dass Mutationen an unterschiedlichen Positionen des gleichen Gens zwei verschiedene Krankheitsphänotypen auslösen können. Dabei treten die verursachenden Mutationen in unterschiedlichen funktionellen Domänen des Proteins auf. Diese These wird durch die bisher bekannten Mutationen im kardialen α -Aktin gestützt. HCM-verursachende Mutationen in diesem Gen treten in Regionen auf, die an der Krafterzeugung beteiligt sind, während DCM-verursachende Mutationen in Regionen identifiziert wurden, die mutmaßlich an der Kraftübertragung beteiligt sind [38].

Im Gegensatz dazu wäre es möglich, dass nur ein einziger Pathomechanismus für beide Krankheitsphänotypen verantwortlich ist, und diese nur eine Abstufung des Mechanismus darstellen. Die in dieser Arbeit beschriebene Mutation Ser642Leu und die bereits bekannte Mutation Ser532Pro im β -MHC-Gen, die beide ausschließlich mit DCM assoziiert sind, treten in der Aktin-Bindungsregion des Myosins auf [48]. Diese Region ist wesentlich an der Krafterzeugung beteiligt und stellt eine der vier Hauptregionen dar, in denen HCM-Mutationen auftreten [122]. Ob eine Mutation zu DCM oder HCM führt, muss also von weiteren Faktoren abhängig sein. Eine Möglichkeit könnte das Ausmaß des Kontraktionsdefizits sein. Geringe Defizite könnten durch Hypertrophie kompensiert werden, während eine schwere Dysfunktion des Sarkomers nicht zur effektiven

Kompensation ausreicht und somit zur Dilatation führt. Studien an genetisch veränderten Mäusen haben gezeigt, dass heterozygote Mäuse, die die Mutation Arg403Gln im α -MHC-Gen tragen, eine HCM entwickeln, während homozygote Mäuse eine schnell progressive DCM zeigten [123, 124]. Ähnliche Ergebnisse konnten McConnell et al. bei MYBPC3 erzielen [125]. Des Weiteren wurden bei Patienten mit HCM eine Dekompensation des Herzens und ein Übergang in die dilatative Form beobachtet („burn-out“) [101].

Tabelle 4-2: Alle bekannten DCM-Mutationen in Sarkomerprotein-Genen

Gen	Genort	Protein	Mutation	Anzahl der Familien	Referenz
MYH7	14q12	β -MHC	Ile201Thr	1 Familie	Villard 2005 [120]
			Ala223Thr	1 Indexpatient	diese Studie
			Thr412Asn	1 Indexpatient	Villard 2005 [120]
			Ser532Pro	1 Familie	Kamisago 2000 [48]
			Ala550Val	1 Familie	Villard 2005 [120]
			Ser642Leu	1 Indexpatient	diese Studie
			Phe764Leu	1 Familie	Kamisago 2000 [48]
			Thr1019Asn	1 Familie	Villard 2005 [120]
			Arg1193Ser	1 Familie	Villard 2005 [120]
			Glu1426Lys	1 Familie	Villard 2005 [120]
Arg1500Trp	1 Indexpatient	Kärkkäinen 2004 [126]			
Arg1634Cys	1 Indexpatient	Villard 2005 [120]			
TNNT2*	1q32	Troponin T	Arg131Trp	1 Familie	Mogensen 2004 [69]
			Arg141Trp	1 Familie	Li 2001 [127]
				1 Familie	Villard 2005 [120]
			Ala172Ser	1 Familie	Stefanelli 2004 [128]
			Arg205Leu	1 Familie	Mogensen 2004 [69]
			Lys210del	2 Familien	Kamisago 2000 [48]
				1 Familie	Hanson 2002 [129]
	1 Familie	Mogensen 2004 [69]			
	1 Familie	Mogensen 2004 [69]			
TPM1	15q22.1	α -Tropomyosin	Glu40Lys	1 Familie	Olson 2001 [65]
			Glu54Lys	1 Indexpatient	Olson 2001 [65]
MYBPC3	11p11.2	Myosin-Bindungsprotein C	Asn948Thr	1 Indexpatient	Daehmlow 2002 [64]
TNNI3	19q13.4	Troponin I	Ala2Val	1 Familie	Murphy 2004 [67]
TNNC1	3p21.3-14.3	Troponin C	Gly159Arg	1 Familie	Mogensen 2004 [69]
ACTC	15q11-q14	α -Aktin	Arg312His	1 Familie	Olson 1998 [38]
			Glu361Gly	1 Familie	Olson 1998 [38]

Bisher sind über 20 verschiedene Mutationen in Sarkomerprotein-Genen bei DCM beschrieben, wovon die meisten Missense-Mutationen im β -MHC-Gen sind.

* Die Aminosäure-Position ist nach der GenBank Accession Number AY044273.1 angegeben.

4.6 Mögliche funktionelle Effekte der Mutationen Ala223Thr und Ser642Leu

Einige Argumente sprechen für ein krankheitsverursachendes Potential der beiden Mutationen Ala223Thr und Ser642Leu im β -MHC-Gen. Erstens waren die Mutationen weder bei 136 HCM-Patienten, noch bei 88 gesunden Kontrollpersonen, die im Rahmen dieser Studie untersucht wurden, vorhanden. Bei den Varianten handelt es sich also nicht um Polymorphismen. Zweitens sind die Bereiche, in denen die Mutationen liegen, evolutionär konserviert. Lediglich bei *Drosophila melanogaster* ist an Position 223 bereits die Aminosäure Threonin und an Position 642 Glycin vorhanden. Dies legt nahe, dass diese Aminosäure-Reste für eine normale Proteinfunktion wichtig sind.

Beide Mutationen wurden von der Arbeitsgruppe Frömmel an der Charité mit dem STRAP-Programm (Editor for Structural Alignment of Proteins) [130] auf die Proteinstruktur des Myosins projiziert (siehe 3.2.1.3). Die neu gefundenen Mutationen wurden neben den bereits bekannten in der dreidimensionalen Struktur des Proteins dargestellt. Die Mutation Ala223Thr liegt in der Nähe der ATP-Bindungsstelle, in der oberen 50 kDa Domäne des β -MHC. Der Platzbedarf der Aminosäure Threonin ist geringfügig größer als der von Alanin. Dieser Größenunterschied könnte dazu führen, dass Threonin schwieriger in die Proteinstruktur einzufügen ist und es dadurch zu einer Veränderung der Raumstruktur des Proteins kommt. Der Austausch könnte die Thermostabilität verringern und die Proteinfaltung und somit die Proteinmotilität beeinträchtigen [131]. Außerdem ist Ala223Thr neben der HCM-verursachenden Mutation Gln222Lys lokalisiert [122], was die funktionelle Relevanz dieser Region bestärkt.

Das Ergebnis der STRAP-Analyse für Ser642Leu deutet auf funktionelle Veränderungen der Aktin-Myosin-Interaktion hin. Die Mutation liegt in einer Schleife des Myosins, die direkt mit Aktin interagiert, wodurch es zu einer Veränderung von Bindungsaffinität und -kinetik kommen könnte. Durch eine verstärkte hydrophobe Wechselwirkung könnte die Interaktion verstärkt oder umgekehrt die Affinität durch den Verlust einer Wasserstoffbrückenbindung vermindert werden. Da Leucin größer ist als Serin, könnte außerdem die chemische Reaktionsfähigkeit beeinflusst werden. Weiterhin ist die DCM-verursachende Mutation Ser532Pro ebenfalls in der Aktin-Myosin-Bindungsregion lokalisiert [48]. Da HCM-verursachende Mutationen häufig um spezifische Loci gruppiert sind [122], könnte dies auch für DCM-verursachende Varianten zutreffen. Die Aktin-Myosin-Bindungsregion könnte so ein spezifischer Locus sein.

Mehrere molekulare Pathomechanismen als Ursache der dilatativen Kardiomyopathie werden diskutiert. So können Defizite in der Kraftübertragung und in der Kraft-erzeugung, aber auch ein Energiedefizit oder vorzeitige Apoptose zur dilatativen Kardiomyopathie führen [132]. Auch die Mutation Ser642Leu in der Aktin-Myosin-Bindungsregion kann zu einer verminderten Krafterzeugung führen.

Ein definitiver Nachweis der krankheitsverursachenden Natur der Varianten ist jedoch nicht möglich, da keine Familienmitglieder zur Berechnung eines Zweipunkt LOD-Score verfügbar waren. Nächste Schritte wären einerseits die Untersuchung weiterer Familien auf die beiden Mutationen in diesen Genen und andererseits ein transgenes Mausmodell, um die funktionelle Relevanz der Mutationen zu bestärken.

4.7 Bedeutung der molekulargenetischen Diagnostik von DCM

Die systematische Mutationssuche in den Sarkomerprotein-Genen für β -MHC und Troponin T bei 46 Patienten mit idiopathischer DCM ergab bei zwei Patienten eine Mutation mit krankheitsverursachendem Potential. Bei den restlichen 44 Patienten basiert die Krankheit wahrscheinlich auf anderen Ursachen, wobei ein Patient Träger einer Mutation im Myosin-Bindungsprotein C-Gen ist [64]. Dies bestätigt die Vielfalt der möglichen Ursachen und Pathomechanismen der DCM [132].

Da DCM in 20 bis 35 % der Fälle eine familiäre Erkrankung ist [19, 20], ist eine detaillierte Familienanamnese und die Untersuchung von erstgradig Verwandten sinnvoll. Mittels EKG und Echokardiographie kann bei 5 bis 10 % der Verwandten eine bisher asymptomatische DCM diagnostiziert und bei weiteren 25 % eine Dilatation des linken Ventrikels oder eine verminderte Ejektionsfraktion festgestellt werden [133]. Darüber hinaus haben die COMET- und SOLVD-Studie gezeigt, dass eine prophylaktische Herzinsuffizienz-Therapie bei asymptomatischen Personen mit verminderter systolischer Funktion einen positiven Einfluss auf den Krankheitsverlauf hat [134, 135]. Daher ist es denkbar, dass die frühe Diagnose und Behandlung asymptomatischer Patienten mit familiärer DCM auch ihre Prognose verbessern kann [136]. Insbesondere die Gefahr des plötzlichen Herztodes, wie sie bei Patienten mit Mutationen im Troponin T-Gen besteht, rechtfertigt eine regelmäßige klinische Untersuchung von Verwandten [69]. So kann die Diagnose gesichert und frühzeitig ein ICD implantiert werden.

Inwieweit ein genetisches Screening bei DCM-Patienten sinnvoll ist, ist schwer abzuschätzen. Für die tägliche Praxis ist es sicherlich noch nicht geeignet, denn es gibt

zu viele unterschiedliche Gene, die mit DCM assoziiert sind, und häufig sind nur die Genorte bekannt. Auch sind der Verlauf und die Penetranz nicht vorhersehbar. Die genetische Diagnose ist jedoch für die Identifizierung von asymptomatischen Mutationsträgern und von Verwandten mit normalem Genotyp hilfreich. So kann entschieden werden, wer eine regelmäßige Untersuchung benötigt. Darüber hinaus erhofft man sich durch die genetische Untersuchung, die Erkrankung besser zu verstehen, das Risiko besser einschätzen zu können und die Behandlungsstrategie zu optimieren. Die Kenntnis der Ursachen und Pathomechanismen der Erkrankung wird die Entwicklung neuer spezifischer diagnostischer und therapeutischer Strategien ermöglichen - mit dem Ziel, die schlechte Prognose der dilatativen Kardiomyopathie zu verbessern, die derzeit die häufigste Indikation zur Herztransplantation bei jüngeren Erwachsenen darstellt [137].

5 Zusammenfassung

Die dilatative Kardiomyopathie ist durch eine Dilatation und eingeschränkte systolische Funktion des linken oder beider Ventrikel gekennzeichnet. Eine familiäre Häufung tritt bei 20 bis 35 % der Erkrankten auf. Die ersten identifizierten Krankheitsgene kodierten alle für Proteine des Zytoskeletts. Deshalb wurde DCM als Erkrankung des Zytoskeletts bezeichnet. Bei der hypertrophen Kardiomyopathie wurden bisher mehr als 250 Mutationen in neun Genen für Sarkomerproteine beschrieben. Deshalb wurde die HCM als Erkrankung des Sarkomers bezeichnet. In den letzten Jahren wurde dieses Konzept jedoch durch Entdeckung von Mutationen in Sarkomerprotein-Genen bei DCM in Frage gestellt.

Vor diesem Hintergrund wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit eine systematische Mutationssuche in den Sarkomerprotein-Genen β -MHC und Troponin T bei 46 nicht verwandten Patienten mit idiopathischer dilatativer Kardiomyopathie durchgeführt. Die DNA der Patienten wurde aus Leukozyten isoliert und mittels PCR amplifiziert. Im Anschluss daran erfolgte eine SSCP-Analyse der einzelnen Fragmente bei Raumtemperatur und 4° C. Proben mit abweichendem Bandenmuster wurden sequenziert. Als zusätzliche Bestätigung der Varianten wurde entweder eine Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismen-Analyse, eine Heteroduplexanalyse oder eine erneute Sequenzierung eines unabhängigen PCR-Produkts angewandt.

Im β -MHC-Gen konnten wir die potentiell krankheitsrelevanten Mutationen Ala223Thr (g.7799G>A) und Ser642Leu (g.12164C>T) identifizieren. Beide Mutationen wurden bisher weder bei DCM noch bei HCM beschrieben. Weiterhin wurden sie nicht bei 136 HCM-Patienten und 88 Kontroll-Personen gefunden. Die Mutationen wurden von der Arbeitsgruppe Frömmel an der Charité mit dem Editor for Structural Alignment of Proteins (STRAP) auf die Proteinstruktur des Myosins projiziert. In dieser Darstellung ist erkennbar, dass die Mutation Ala223Thr in der oberen 50 kDa Domäne liegt. Da Threonin geringfügig größer als Alanin ist, könnte dadurch die Raumstruktur des Proteins verändert werden. Außerdem könnte die Thermostabilität verringert und die Faltstruktur von β -MHC beeinflusst werden. Die HCM-assoziierte Mutation Gln222Lys liegt ebenfalls in diesem Bereich direkt daneben. Damit ist diese sehr variable Region sowohl mit DCM als auch mit HCM assoziiert.

Die STRAP-Analyse der Mutation Ser642Leu zeigte, dass diese in der Aktin-Myosin-Bindungsregion liegt. Durch eine verstärkte hydrophobe Wechselwirkung könnte die

Interaktion verstärkt oder umgekehrt die Affinität durch den Verlust einer Wasserstoffbrücken-Bindung vermindert werden. Da Leucin größer ist als Serin, könnte außerdem die chemische Reaktionsfähigkeit beeinflusst werden. Die bereits bekannte DCM-assoziierte Mutation Ser532Pro liegt ebenfalls in diesem Bereich. Durch eine Verminderung der Krafterzeugung könnten die beiden Mutationen zu dilatativer Kardiomyopathie führen.

Weiterhin wurden die zwei Mutationen IVS11+23A>T (g.8914A>T) und Asp376Asp (g.9666C>T) identifiziert. Beide Mutationen sind wahrscheinlich nicht krankheitsverursachend. Außerdem konnten sechs Polymorphismen beobachtet werden, die auch bei HCM zu finden sind. Auch bei ihnen bleibt die Aminosäuresequenz erhalten. Es ergaben sich keine Anhaltspunkte auf eine funktionelle Relevanz dieser Polymorphismen. Der Vergleich der Allel- und Genotypfrequenzen mit einer HCM-Kontroll-Gruppe zeigte keinen signifikanten Unterschied.

Im Troponin T-Gen wurden keine Mutationen identifiziert, jedoch zeigte die Analyse sechs Polymorphismen. Diese Polymorphismen sind auch bei HCM bekannt. Die statistische Auswertung zeigte auch hier keinen signifikanten Unterschied in der Allel- und Genotypfrequenz bei DCM und HCM.

Bis zum heutigen Zeitpunkt wurden insgesamt 21 verschiedene Krankheitsgene und fünf Genorte identifiziert, die mit dilatativer Kardiomyopathie assoziiert sind. Neben Mutationen in Genen für Proteine des Zytoskeletts, der Z-Scheibe und von Ionenkanälen sind mittlerweile Mutationen in sieben Sarkomerprotein-Genen bei DCM identifiziert worden. In der vorliegenden Dissertation konnte also bestätigt werden, dass Mutationen in Sarkomerprotein-Genen sowohl zu hypertropher Kardiomyopathie als auch zu dilatativer Kardiomyopathie führen können.

6 Literaturverzeichnis

- [1] Brigden, W. (1957): Uncommon myocardial diseases: the non-coronary cardiomyopathies, *Lancet* 2, Seite 1179-84.
- [2] Goodwin, J. F. und Oakley, C. M. (1972): The cardiomyopathies, *Br Heart J* 34 [6], Seite 545-52.
- [3] (1980): Report of the WHO/ISFC task force on the definition and classification of cardiomyopathies, *Br Heart J* 44 [6], Seite 672-3.
- [4] Richardson, P.; McKenna, W.; Bristow, M.; Maisch, B.; Mautner, B.; O'Connell, J.; Olsen, E.; Thiene, G.; Goodwin, J.; Gyarfás, I.; Martin, I. und Nordet, P. (1996): Report of the 1995 World Health Organization/International Society and Federation of Cardiology Task Force on the Definition and Classification of cardiomyopathies, *Circulation* 93 [5], Seite 841-2.
- [5] Felker, G. M.; Thompson, R. E.; Hare, J. M.; Hruban, R. H.; Clemetson, D. E.; Howard, D. L.; Baughman, K. L. und Kasper, E. K. (2000): Underlying causes and long-term survival in patients with initially unexplained cardiomyopathy, *N Engl J Med* 342 [15], Seite 1077-84.
- [6] Codd, M. B.; Sugrue, D. D.; Gersh, B. J. und Melton, L. J., 3rd (1989): Epidemiology of idiopathic dilated and hypertrophic cardiomyopathy. A population-based study in Olmsted County, Minnesota, 1975-1984, *Circulation* 80 [3], Seite 564-72.
- [7] Rakar, S.; Sinagra, G.; Di Lenarda, A.; Poletti, A.; Bussani, R.; Silvestri, F. und Camerini, F. (1997): Epidemiology of dilated cardiomyopathy. A prospective post-mortem study of 5252 necropsies. The Heart Muscle Disease Study Group, *Eur Heart J* 18 [1], Seite 117-23.
- [8] Komajda, M.; Jais, J. P.; Reeves, F.; Goldfarb, B.; Bouhour, J. B.; Juillieres, Y.; Lanfranchi, J.; Peycelon, P.; Geslin, P.; Carrie, D. und et al. (1990): Factors predicting mortality in idiopathic dilated cardiomyopathy, *Eur Heart J* 11 [9], Seite 824-31.
- [9] Sugrue, D. D.; Rodeheffer, R. J.; Codd, M. B.; Ballard, D. J.; Fuster, V. und Gersh, B. J. (1992): The clinical course of idiopathic dilated cardiomyopathy. A population-based study, *Ann Intern Med* 117 [2], Seite 117-23.
- [10] Johnson, R. A. und Palacios, I. (1982): Dilated cardiomyopathies of the adult (first of two parts), *N Engl J Med* 307 [17], Seite 1051-8.
- [11] Aretz, H. T. (1987): Myocarditis: the Dallas criteria, *Hum Pathol* 18 [6], Seite 619-24.
- [12] Maisch, B.; Portig, I.; Ristic, A.; Hufnagel, G. und Pankuweit, S. (2000): Definition of inflammatory cardiomyopathy (myocarditis): on the way to consensus. A status report, *Herz* 25 [3], Seite 200-9.
- [13] Hoppe, U. C.; Bohm, M.; Dietz, R.; Hanrath, P.; Kroemer, H. K.; Osterspey, A.; Schmaltz, A. A. und Erdmann, E. (2005): Leitlinien zur Therapie der chronischen Herzinsuffizienz, *Z Kardiol* 94 [8], Seite 488-509.
- [14] Swedberg, K.; Cleland, J.; Dargie, H.; Drexler, H.; Follath, F.; Komajda, M.; Tavazzi, L.; Smiseth, O. A.; Gavazzi, A.; Haverich, A.; Hoes, A.; Jaarsma, T.; Korewicki, J.; Levy, S.; Linde, C.; Lopez-Sendon, J. L.; Nieminen, M. S.; Pierard, L. und Remme, W. J. (2005): Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic heart failure: executive summary (update 2005): The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Chronic Heart Failure of the European Society of Cardiology, *Eur Heart J* 26 [11], Seite 1115-40. Epub 2005 May 18.
- [15] Battersby, E.J. und Glenner, G.G. (1961): Familial cardiomyopathy, *Am J Med* 30, Seite 382-91.
- [16] Schrader, W.H.; Pankey, G.A.; Davis, R.B. und Theologides, A. (1961): Familial idiopathic cardiomegaly, *Circulation* 24, Seite 599-606.
- [17] Whitfield, A.G. (1961): Familial cardiomyopathy, *Quart J Med* 3, Seite 119-34.
- [18] Mestroni, L.; Maisch, B.; McKenna, W. J.; Schwartz, K.; Charron, P.; Rocco, C.; Tesson, F.; Richter, A.; Wilke, A. und Komajda, M. (1999): 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], Seite 93-102.

- [19] Michels, V. V.; Moll, P. P.; Miller, F. A.; Tajik, A. J.; Chu, J. S.; Driscoll, D. J.; Burnett, J. C.; Rodeheffer, R. J.; Chesebro, J. H. und Tazelaar, H. D. (1992): The frequency of familial dilated cardiomyopathy in a series of patients with idiopathic dilated cardiomyopathy, *N Engl J Med* 326 [2], Seite 77-82.
- [20] Grünig, E.; Tasman, J. A.; Kucherer, H.; Franz, W.; Kubler, W. und Katus, H. A. (1998): Frequency and phenotypes of familial dilated cardiomyopathy, *J Am Coll Cardiol* 31 [1], Seite 186-94.
- [21] Mestroni, L.; Rocco, C.; Gregori, D.; Sinagra, G.; Di Lenarda, A.; Miodini, S.; Vatta, M.; Pinamonti, B.; Muntoni, F.; Caforio, A. L.; McKenna, W. J.; Falaschi, A.; Giacca, M. und Camerini (1999): Familial dilated cardiomyopathy: evidence for genetic and phenotypic heterogeneity. Heart Muscle Disease Study Group, *J Am Coll Cardiol* 34 [1], Seite 181-90.
- [22] Kelly, D. P. und Strauss, A. W. (1994): Inherited cardiomyopathies, *N Engl J Med* 330 [13], Seite 913-9.
- [23] Suomalainen, A.; Paetau, A.; Leinonen, H.; Majander, A.; Peltonen, L. und Somer, H. (1992): Inherited idiopathic dilated cardiomyopathy with multiple deletions of mitochondrial DNA, *Lancet* 340 [8831], Seite 1319-20.
- [24] Zeviani, M.; Servadei, S.; Gellera, C.; Bertini, E.; DiMauro, S. und DiDonato, S. (1989): An autosomal dominant disorder with multiple deletions of mitochondrial DNA starting at the D-loop region, *Nature* 339 [6222], Seite 309-11.
- [25] Bowles, N. E.; Bowles, K. R. und Towbin, J. A. (2000): The "final common pathway" hypothesis and inherited cardiovascular disease. The role of cytoskeletal proteins in dilated cardiomyopathy, *Herz* 25 [3], Seite 168-75.
- [26] Jung, M.; Poepping, I.; Perrot, A.; Ellmer, A. E.; Wienker, T. F.; Dietz, R.; Reis, A. und Osterziel, K. J. (1999): Investigation of a family with autosomal dominant dilated cardiomyopathy defines a novel locus on chromosome 2q14-q22, *Am J Hum Genet* 65 [4], Seite 1068-77.
- [27] Sylvius, N.; Tesson, F.; Gayet, C.; Charron, P.; Benaiche, A.; Peuchmaurd, M.; Duboscq-Bidot, L.; Feingold, J.; Beckmann, J. S.; Bouchier, C. und Komajda, M. (2001): A new locus for autosomal dominant dilated cardiomyopathy identified on chromosome 6q12-q16, *Am J Hum Genet* 68 [1], Seite 241-6.
- [28] Messina, D. N.; Speer, M. C.; Pericak-Vance, M. A. und McNally, E. M. (1997): Linkage of familial dilated cardiomyopathy with conduction defect and muscular dystrophy to chromosome 6q23, *Am J Hum Genet* 61 [4], Seite 909-17.
- [29] Krajcinovic, M.; Pinamonti, B.; Sinagra, G.; Vatta, M.; Severini, G. M.; Milasin, J.; Falaschi, A.; Camerini, F.; Giacca, M. und Mestroni, L. (1995): Linkage of familial dilated cardiomyopathy to chromosome 9. Heart Muscle Disease Study Group, *Am J Hum Genet* 57 [4], Seite 846-52.
- [30] Bowles, K. R.; Gajarski, R.; Porter, P.; Goytia, V.; Bachinski, L.; Roberts, R.; Pignatelli, R. und Towbin, J. A. (1996): Gene mapping of familial autosomal dominant dilated cardiomyopathy to chromosome 10q21-23, *J Clin Invest* 98 [6], Seite 1355-60.
- [31] Osterziel, K. J. und Perrot, A. (2005): Dilated cardiomyopathy: more genes means more phenotypes, *Eur Heart J* 21, Seite 21.
- [32] Muntoni, F.; Cau, M.; Ganau, A.; Congiu, R.; Arvedi, G.; Mateddu, A.; Marrosu, M. G.; Cianchetti, C.; Realdi, G.; Cao, A. und et al. (1993): Brief report: deletion of the dystrophin muscle-promoter region associated with X-linked dilated cardiomyopathy, *N Engl J Med* 329 [13], Seite 921-5.
- [33] Hoffman, E. P.; Brown, R. H., Jr. und Kunkel, L. M. (1987): Dystrophin: the protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus, *Cell* 51 [6], Seite 919-28.
- [34] Tsubata, S.; Bowles, K. R.; Vatta, M.; Zintz, C.; Titus, J.; Muhonen, L.; Bowles, N. E. und Towbin, J. A. (2000): Mutations in the human delta-sarcoglycan gene in familial and sporadic dilated cardiomyopathy, *J Clin Invest* 106 [5], Seite 655-62.

- [35] Li, D.; Tapscoft, T.; Gonzalez, O.; Burch, P. E.; Quinones, M. A.; Zoghbi, W. A.; Hill, R.; Bachinski, L. L.; Mann, D. L. und Roberts, R. (1999): Desmin mutation responsible for idiopathic dilated cardiomyopathy, *Circulation* 100 [5], Seite 461-4.
- [36] Kass, S.; MacRae, C.; Graber, H. L.; Sparks, E. A.; McNamara, D.; Boudoulas, H.; Basson, C. T.; Baker, P. B., 3rd; Cody, R. J. und andere (1994): A gene defect that causes conduction system disease and dilated cardiomyopathy maps to chromosome 1p1-1q1, *Nat Genet* 7 [4], Seite 546-51.
- [37] Fatkin, D.; MacRae, C.; Sasaki, T.; Wolff, M. R.; Porcu, M.; Frenneaux, M.; Atherton, J.; Vidaillet, H. J., Jr.; Spudich, S.; De Girolami, U.; Seidman, J. G.; Seidman, C.; Muntoni, F.; Muehle, G.; Johnson, W. und McDonough, B. (1999): Missense mutations in the rod domain of the lamin A/C gene as causes of dilated cardiomyopathy and conduction-system disease, *N Engl J Med* 341 [23], Seite 1715-24.
- [38] Olson, T. M.; Michels, V. V.; Thibodeau, S. N.; Tai, Y. S. und Keating, M. T. (1998): Actin mutations in dilated cardiomyopathy, a heritable form of heart failure, *Science* 280 [5364], Seite 750-2.
- [39] Seidman, J. G. und Seidman, C. (2001): The genetic basis for cardiomyopathy: from mutation identification to mechanistic paradigms, *Cell* 104 [4], Seite 557-67.
- [40] Royal Prince Alfred Hospital Sydney, Australien: FHC mutation database. URL: <http://www.angis.org.au/pbin/Databases/Heart/fhc-query.cgi>. Stand: 15. März 2005.
- [41] University of Wales College of Medicine, UK: Human Gene Mutation Database at the Institute of Medical Genetics. URL: <http://archive.uwcm.ac.uk/uwcm/mg/hgmd0.html>. Stand: 15. März 2005.
- [42] CardioGenomics Program for Genomic Applications Project 3 Boston, USA: Mutation database. URL: <http://genetics.med.harvard.edu/~seidman/cg3>. Stand: 15. März 2005.
- [43] Satoh, M.; Takahashi, M.; Sakamoto, T.; Hiroe, M.; Marumo, F. und Kimura, A. (1999): Structural analysis of the titin gene in hypertrophic cardiomyopathy: identification of a novel disease gene, *Biochem Biophys Res Commun* 262 [2], Seite 411-7.
- [44] Blair, E.; Redwood, C.; Ashrafian, H.; Oliveira, M.; Broxholme, J.; Kerr, B.; Salmon, A.; Ostman-Smith, I. und Watkins, H. (2001): Mutations in the gamma(2) subunit of AMP-activated protein kinase cause familial hypertrophic cardiomyopathy: evidence for the central role of energy compromise in disease pathogenesis, *Hum Mol Genet* 10 [11], Seite 1215-20.
- [45] Geier, C.; Perrot, A.; Ozcelik, C.; Binner, P.; Counsell, D.; Hoffmann, K.; Pilz, B.; Martiniak, Y.; Gehmlich, K.; van der Ven, P. F.; Furst, D. O.; Vornwald, A.; von Hodenberg, E.; Nurnberg, P.; Scheffold, T.; Dietz, R. und Osterziel, K. J. (2003): Mutations in the human muscle LIM protein gene in families with hypertrophic cardiomyopathy, *Circulation* 107 [10], Seite 1390-5.
- [46] Hayashi, T.; Arimura, T.; Itoh-Satoh, M.; Ueda, K.; Hohda, S.; Inagaki, N.; Takahashi, M.; Hori, H.; Yasunami, M.; Nishi, H.; Koga, Y.; Nakamura, H.; Matsuzaki, M.; Choi, B. Y.; Bae, S. W.; You, C. W.; Han, K. H.; Park, J. E.; Knoll, R.; Hoshijima, M.; Chien, K. R. und Kimura, A. (2004): Tcap gene mutations in hypertrophic cardiomyopathy and dilated cardiomyopathy, *J Am Coll Cardiol* 44 [11], Seite 2192-201.
- [47] Thierfelder, L.; Watkins, H.; MacRae, C.; Lamas, R.; McKenna, W.; Vosberg, H. P.; Seidman, J. G. und Seidman, C. E. (1994): Alpha-tropomyosin and cardiac troponin T mutations cause familial hypertrophic cardiomyopathy: a disease of the sarcomere, *Cell* 77 [5], Seite 701-12.
- [48] Kamisago, M.; Sharma, S. D.; DePalma, S. R.; Solomon, S.; Sharma, P.; McDonough, B.; Smoot, L.; Mullen, M. P.; Woolf, P. K.; Wagle, E. D.; Seidman, J. G. und Seidman, C. E. (2000): Mutations in sarcomere protein genes as a cause of dilated cardiomyopathy, *N Engl J Med* 343 [23], Seite 1688-96.
- [49] Saez, L. J.; Gianola, K. M.; McNally, E. M.; Feghali, R.; Eddy, R.; Shows, T. B. und Leinwand, L. A. (1987): Human cardiac myosin heavy chain genes and their linkage in the genome, *Nucleic Acids Res* 15 [13], Seite 5443-59.

- [50] Matsuoka, R.; Yoshida, M. C.; Kanda, N.; Kimura, M.; Ozasa, H. und Takao, A. (1989): Human cardiac myosin heavy chain gene mapped within chromosome region 14q11.2----q13, *Am J Med Genet* 32 [2], Seite 279-84.
- [51] Jaenicke, T.; Diederich, K. W.; Haas, W.; Schleich, J.; Lichter, P.; Pfordt, M.; Bach, A. und Vosberg, H. P. (1990): The complete sequence of the human beta-myosin heavy chain gene and a comparative analysis of its product, *Genomics* 8 [2], Seite 194-206.
- [52] Geisterfer-Lowrance, A. A.; Kass, S.; Tanigawa, G.; Vosberg, H. P.; McKenna, W.; Seidman, C. E. und Seidman, J. G. (1990): A molecular basis for familial hypertrophic cardiomyopathy: a beta cardiac myosin heavy chain gene missense mutation, *Cell* 62 [5], Seite 999-1006.
- [53] Paré, J.A.P.; Fraser, R.G.; Pirozynski, W.J.; Shanks, J.A. und Stubington, D. (1961): Hereditary cardiovascular dysplasia: a form of familial cardiomyopathy, *Am J Med* 31, Seite 37-62.
- [54] Richard, P.; Charron, P.; Carrier, L.; Ledeuil, C.; Cheav, T.; Pichereau, C.; Benaiche, A.; Isnard, R.; Dubourg, O.; Burban, M.; Gueffet, J. P.; Millaire, A.; Desnos, M.; Schwartz, K.; Hainque, B. und Komajda, M. (2003): Hypertrophic cardiomyopathy: distribution of disease genes, spectrum of mutations, and implications for a molecular diagnosis strategy, *Circulation* 107 [17], Seite 2227-32.
- [55] Bonne, G.; Carrier, L.; Richard, P.; Hainque, B. und Schwartz, K. (1998): Familial hypertrophic cardiomyopathy: from mutations to functional defects, *Circ Res* 83 [6], Seite 580-93.
- [56] Anderson, P. A.; Greig, A.; Mark, T. M.; Malouf, N. N.; Oakeley, A. E.; Ungerleider, R. M.; Allen, P. D. und Kay, B. K. (1995): Molecular basis of human cardiac troponin T isoforms expressed in the developing, adult, and failing heart, *Circ Res* 76 [4], Seite 681-6.
- [57] Mesnard, L.; Logeart, D.; Taviaux, S.; Diriong, S.; Mercadier, J. J. und Samson, F. (1995): Human cardiac troponin T: cloning and expression of new isoforms in the normal and failing heart, *Circ Res* 76 [4], Seite 687-92.
- [58] Zot, A. S. und Potter, J. D. (1987): Structural aspects of troponin-tropomyosin regulation of skeletal muscle contraction, *Annu Rev Biophys Biophys Chem* 16, Seite 535-59.
- [59] Townsend, P. J.; Farza, H.; MacGeoch, C.; Spurr, N. K.; Wade, R.; Gahlmann, R.; Yacoub, M. H. und Barton, P. J. (1994): Human cardiac troponin T: identification of fetal isoforms and assignment of the TNNT2 locus to chromosome 1q, *Genomics* 21 [2], Seite 311-6.
- [60] Jin, J. P.; Huang, Q. Q.; Yeh, H. I. und Lin, J. J. (1992): Complete nucleotide sequence and structural organization of rat cardiac troponin T gene. A single gene generates embryonic and adult isoforms via developmentally regulated alternative splicing, *J Mol Biol* 227 [4], Seite 1269-76.
- [61] Forissier, J. F.; Carrier, L.; Farza, H.; Bonne, G.; Bercovici, J.; Richard, P.; Hainque, B.; Townsend, P. J.; Yacoub, M. H.; Faure, S.; Dubourg, O.; Millaire, A.; Hagege, A. A.; Desnos, M.; Komajda, M. und Schwartz, K. (1996): Codon 102 of the cardiac troponin T gene is a putative hot spot for mutations in familial hypertrophic cardiomyopathy, *Circulation* 94 [12], Seite 3069-73.
- [62] Moolman, J. C.; Corfield, V. A.; Posen, B.; Ngumbela, K.; Seidman, C.; Brink, P. A. und Watkins, H. (1997): Sudden death due to troponin T mutations, *J Am Coll Cardiol* 29 [3], Seite 549-55.
- [63] Watkins, H.; Conner, D.; Thierfelder, L.; Jarcho, J. A.; MacRae, C.; McKenna, W. J.; Maron, B. J.; Seidman, J. G. und Seidman, C. E. (1995): Mutations in the cardiac myosin binding protein-C gene on chromosome 11 cause familial hypertrophic cardiomyopathy, *Nat Genet* 11 [4], Seite 434-7.
- [64] Daehmlow, S.; Erdmann, J.; Knueppel, T.; Gille, C.; Froemmel, C.; Hummel, M.; Hetzer, R. und Regitz-Zagrosek, V. (2002): Novel mutations in sarcomeric protein genes in dilated cardiomyopathy, *Biochem Biophys Res Commun* 298 [1], Seite 116-20.
- [65] Olson, T. M.; Kishimoto, N. Y.; Whitby, F. G. und Michels, V. V. (2001): Mutations that alter the surface charge of alpha-tropomyosin are associated with dilated cardiomyopathy, *J Mol Cell Cardiol* 33 [4], Seite 723-32.

- [66] Kimura, A.; Harada, H.; Park, J. E.; Nishi, H.; Satoh, M.; Takahashi, M.; Hiroi, S.; Sasaoka, T.; Ohbuchi, N.; Nakamura, T.; Koyanagi, T.; Hwang, T. H.; Choo, J. A.; Chung, K. S.; Hasegawa, A.; Nagai, R.; Okazaki, O.; Nakamura, H.; Matsuzaki, M.; Sakamoto, T.; Toshima, H.; Koga, Y.; Imaizumi, T. und Sasazuki, T. (1997): Mutations in the cardiac troponin I gene associated with hypertrophic cardiomyopathy, *Nat Genet* 16 [4], Seite 379-82.
- [67] Murphy, R. T.; Mogensen, J.; Shaw, A.; Kubo, T.; Hughes, S. und McKenna, W. J. (2004): Novel mutation in cardiac troponin I in recessive idiopathic dilated cardiomyopathy, *Lancet* 363 [9406], Seite 371-2.
- [68] Hoffmann, B.; Schmidt-Traub, H.; Perrot, A.; Osterziel, K. J. und Gessner, R. (2001): First mutation in cardiac troponin C, L29Q, in a patient with hypertrophic cardiomyopathy, *Hum Mutat* 17 [6], Seite 524.
- [69] Mogensen, J.; Murphy, R. T.; Shaw, T.; Bahl, A.; Redwood, C.; Watkins, H.; Burke, M.; Elliott, P. M. und McKenna, W. J. (2004): Severe disease expression of cardiac troponin C and T mutations in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy, *J Am Coll Cardiol* 44 [10], Seite 2033-40.
- [70] Mogensen, J.; Klausen, I. C.; Pedersen, A. K.; Egeblad, H.; Bross, P.; Kruse, T. A.; Gregersen, N.; Hansen, P. S.; Baandrup, U. und Borglum, A. D. (1999): Alpha-cardiac actin is a novel disease gene in familial hypertrophic cardiomyopathy, *J Clin Invest* 103 [10], Seite R39-43.
- [71] Poetter, K.; Jiang, H.; Hassanzadeh, S.; Master, S. R.; Chang, A.; Dalakas, M. C.; Rayment, I.; Sellers, J. R.; Fananapazir, L. und Epstein, N. D. (1996): Mutations in either the essential or regulatory light chains of myosin are associated with a rare myopathy in human heart and skeletal muscle, *Nat Genet* 13 [1], Seite 63-9.
- [72] Gerull, B.; Gramlich, M.; Atherton, J.; McNabb, M.; Trombitas, K.; Sasse-Klaassen, S.; Seidman, J. G.; Seidman, C.; Granzier, H.; Labeit, S.; Frenneaux, M. und Thierfelder, L. (2002): Mutations of TTN, encoding the giant muscle filament titin, cause familial dilated cardiomyopathy, *Nat Genet* 30 [2], Seite 201-4.
- [73] Knöll, R.; Hoshijima, M.; Hoffman, H. M.; Person, V.; Lorenzen-Schmidt, I.; Bang, M. L.; Hayashi, T.; Shiga, N.; Yasukawa, H.; Schaper, W.; McKenna, W.; Yokoyama, M.; Schork, N. J.; Omens, J. H.; McCulloch, A. D.; Kimura, A.; Gregorio, C. C.; Poller, W.; Schaper, J.; Schultheiss, H. P. und Chien, K. R. (2002): The cardiac mechanical stretch sensor machinery involves a Z disc complex that is defective in a subset of human dilated cardiomyopathy, *Cell* 111 [7], Seite 943-55.
- [74] Arimura, T.; Hayashi, T.; Terada, H.; Lee, S. Y.; Zhou, Q.; Takahashi, M.; Ueda, K.; Nouchi, T.; Hohda, S.; Shibutani, M.; Hirose, M.; Chen, J.; Park, J. E.; Yasunami, M.; Hayashi, H. und Kimura, A. (2004): A Cypher/ZASP mutation associated with dilated cardiomyopathy alters the binding affinity to protein kinase C, *J Biol Chem* 279 [8], Seite 6746-52.
- [75] Olson, T. M.; Illenberger, S.; Kishimoto, N. Y.; Huttelmaier, S.; Keating, M. T. und Jockusch, B. M. (2002): Metavinculin mutations alter actin interaction in dilated cardiomyopathy, *Circulation* 105 [4], Seite 431-7.
- [76] Schmitt, J. P.; Kamisago, M.; Asahi, M.; Li, G. H.; Ahmad, F.; Mende, U.; Kranias, E. G.; MacLennan, D. H.; Seidman, J. G. und Seidman, C. E. (2003): Dilated cardiomyopathy and heart failure caused by a mutation in phospholamban, *Science* 299 [5611], Seite 1410-3.
- [77] Bienengraeber, M.; Olson, T. M.; Selivanov, V. A.; Kathmann, E. C.; O'Coilain, F.; Gao, F.; Karger, A. B.; Ballew, J. D.; Hodgson, D. M.; Zingman, L. V.; Pang, Y. P.; Alekseev, A. E. und Terzic, A. (2004): ABCC9 mutations identified in human dilated cardiomyopathy disrupt catalytic KATP channel gating, *Nat Genet* 36 [4], Seite 382-7.
- [78] Olson, T. M. und Keating, M. T. (1996): Mapping a cardiomyopathy locus to chromosome 3p22-p25, *J Clin Invest* 97 [2], Seite 528-32.
- [79] McNair, W. P.; Ku, L.; Taylor, M. R.; Fain, P. R.; Dao, D.; Wolfel, E. und Mestroni, L. (2004): SCN5A mutation associated with dilated cardiomyopathy, conduction disorder, and arrhythmia, *Circulation* 110 [15], Seite 2163-7.
- [80] Bione, S.; D'Adamo, P.; Maestrini, E.; Gedeon, A. K.; Bolhuis, P. A. und Toniolo, D. (1996): A novel X-linked gene, G4.5, is responsible for Barth syndrome, *Nat Genet* 12 [4], Seite 385-9.

- [81] Schönberger, J.; Wang, L.; Shin, J. T.; Kim, S. D.; Depreux, F. F.; Zhu, H.; Zon, L.; Pizard, A.; Kim, J. B.; Macrae, C. A.; Mungall, A. J.; Seidman, J. G. und Seidman, C. E. (2005): Mutation in the transcriptional coactivator EYA4 causes dilated cardiomyopathy and sensorineural hearing loss, *Nat Genet* 27, Seite 27.
- [82] Henry, W. L.; Gardin, J. M.; Ware, J. H.; Philips, A. V. und Cooper, T. A. (1980): Echocardiographic measurements in normal subjects from infancy to old age, *Circulation* 62 [5], Seite 1054-61.
- [83] Miller, S. A.; Dykes, D. D. und Polesky, H. F. (1988): A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells, *Nucleic Acids Res* 16 [3], Seite 1215.
- [84] Mullis, K. B. und Faloona, F. A. (1987): Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction, *Methods Enzymol* 155, Seite 335-50.
- [85] Cheng, S.; Chang, S. Y.; Gravitt, P. und Respass, R. (1994): Long PCR, *Nature* 369 [6482], Seite 684-5.
- [86] Orita, M.; Iwahana, H.; Kanazawa, H.; Hayashi, K. und Sekiya, T. (1989): Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms, *Proc Natl Acad Sci U S A* 86 [8], Seite 2766-70.
- [87] Spinardi, L.; Mazars, R. und Theillet, C. (1991): Protocols for an improved detection of point mutations by SSCP, *Nucleic Acids Res* 19 [14], Seite 4009.
- [88] Condie, A.; Eeles, R.; Borresen, A. L.; Coles, C.; Cooper, C. und Prosser, J. (1993): Detection of point mutations in the p53 gene: comparison of single-strand conformation polymorphism, constant denaturant gel electrophoresis, and hydroxylamine and osmium tetroxide techniques, *Hum Mutat* 2 [1], Seite 58-66.
- [89] Glavac, D. und Dean, M. (1993): Optimization of the single-strand conformation polymorphism (SSCP) technique for detection of point mutations, *Hum Mutat* 2 [5], Seite 404-14.
- [90] Grompe, M. (1993): The rapid detection of unknown mutations in nucleic acids, *Nat Genet* 5 [2], Seite 111-7.
- [91] Hayashi, K. und Yandell, D. W. (1993): How sensitive is PCR-SSCP?, *Hum Mutat* 2 [5], Seite 338-46.
- [92] Sanger, F.; Nicklen, S. und Coulson, A. R. (1977): DNA sequencing with chain-terminating inhibitors, *Proc Natl Acad Sci U S A* 74 [12], Seite 5463-7.
- [93] Cooper, D. N. und Schmidtke, J. (1984): DNA restriction fragment length polymorphisms and heterozygosity in the human genome, *Hum Genet* 66 [1], Seite 1-16.
- [94] Max Heiman, Yale University New Haven, USA: Webcutter 2.0. URL: <http://www.firstmarket.com/cutter/cut2.html>
- [95] Nagamine, C. M.; Chan, K. und Lau, Y. F. (1989): A PCR artifact: generation of heteroduplexes, *Am J Hum Genet* 45 [2], Seite 337-9.
- [96] Dianzani, I.; Camaschella, C.; Ponzzone, A. und Cotton, R. G. (1993): Dilemmas and progress in mutation detection, *Trends Genet* 9 [12], Seite 403-5.
- [97] den Dunnen, J. T. und Antonarakis, S. E. (2000): Mutation nomenclature extensions and suggestions to describe complex mutations: a discussion, *Hum Mutat* 15 [1], Seite 7-12.
- [98] HGVS, Human Genome Variation Society: Nomenclature for the description of sequence variations. URL: <http://www.genomic.unimelb.edu.au/mdi/mutnomen/>. Stand: 4. März 2005.
- [99] Erdmann, J.; Daehmlow, S.; Wischke, S.; Senyuva, M.; Werner, U.; Raible, J.; Tanis, N.; Dyachenko, S.; Hummel, M.; Hetzer, R. und Regitz-Zagrosek, V. (2003): Mutation spectrum in a large cohort of unrelated consecutive patients with hypertrophic cardiomyopathy, *Clin Genet* 64 [4], Seite 339-49.

- [100] Regitz-Zagrosek, V.; Erdmann, J.; Wellnhofer, E.; Raible, J. und Fleck, E. (2000): Novel mutation in the alpha-tropomyosin gene and transition from hypertrophic to hypocontractile dilated cardiomyopathy, *Circulation* 102 [17], Seite E112-6.
- [101] Hina, K.; Kusachi, S.; Iwasaki, K.; Nogami, K.; Moritani, H.; Kita, T.; Taniguchi, G. und Tsuji, T. (1993): Progression of left ventricular enlargement in patients with hypertrophic cardiomyopathy: incidence and prognostic value, *Clin Cardiol* 16 [5], Seite 403-7.
- [102] Raible, J.; Kallisch, H.; Erdmann, J. und Regitz-Zagrosek, V. (2001): Sensitivität und Spezifität von SSCP und Temperatur-modulierter Heteroduplexanalyse (TMHA) in der Diagnostik von Mutationen im β MHC-Gen, *Z Kardiologie* 90, Supplement 2, Seite 323.
- [103] Highsmith, W. E., Jr.; Nataraj, A. J.; Jin, Q.; O'Connor, J. M.; El-Nabi, S. H.; Kusakawa, N. und Garner, M. M. (1999): Use of DNA toolbox for the characterization of mutation scanning methods. II: evaluation of single-strand conformation polymorphism analysis, *Electrophoresis* 20 [6], Seite 1195-203.
- [104] Epstein, N. D.; Cohn, G. M.; Cyran, F. und Fananapazir, L. (1992): Differences in clinical expression of hypertrophic cardiomyopathy associated with two distinct mutations in the beta-myosin heavy chain gene. A 908Leu----Val mutation and a 403Arg----Gln mutation, *Circulation* 86 [2], Seite 345-52.
- [105] Philips, A. V. und Cooper, T. A. (2000): RNA processing and human disease, *Cell Mol Life Sci* 57 [2], Seite 235-49.
- [106] Krawczak, M.; Reiss, J. und Cooper, D. N. (1992): The mutational spectrum of single base-pair substitutions in mRNA splice junctions of human genes: causes and consequences, *Hum Genet* 90 [1-2], Seite 41-54.
- [107] Berkeley Drosophila Genome Project, University of California Berkeley, USA: Splice Site Prediction. URL: http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html
- [108] Grantham, R.; Gautier, C.; Gouy, M.; Mercier, R. und Pave, A. (1980): Codon catalog usage and the genome hypothesis, *Nucleic Acids Res* 8 [1], Seite r49-r62.
- [109] Robinson, M.; Lilley, R.; Little, S.; Emtage, J. S.; Yarranton, G.; Stephens, P.; Millican, A.; Eaton, M. und Humphreys, G. (1984): Codon usage can affect efficiency of translation of genes in *Escherichia coli*, *Nucleic Acids Res* 12 [17], Seite 6663-71.
- [110] Bulmer, M. (1988): Codon usage and intragenic position, *J Theor Biol* 133 [1], Seite 67-71.
- [111] Kazusa DNA Research Institute, Japan: Codon Usage Database. URL: <http://www.kazusa.or.jp/codon>. Stand: 15. März 2005.
- [112] Zatkova, A.; Messiaen, L.; Vandenbroucke, I.; Wieser, R.; Fonatsch, C.; Krainer, A. R. und Wimmer, K. (2004): Disruption of exonic splicing enhancer elements is the principal cause of exon skipping associated with seven nonsense or missense alleles of NF1, *Hum Mutat* 24 [6], Seite 491-501.
- [113] Lorson, C. L.; Hahnen, E.; Androphy, E. J. und Wirth, B. (1999): A single nucleotide in the SMN gene regulates splicing and is responsible for spinal muscular atrophy, *Proc Natl Acad Sci U S A* 96 [11], Seite 6307-11.
- [114] Shimizu, M.; Ino, H.; Yasuda, T.; Fujino, N.; Uchiyama, K.; Mabuchi, T.; Konno, T.; Kaneda, T.; Fujita, T.; Masuta, E.; Kato, M.; Funada, A. und Mabuchi, H. (2005): Gene mutations in adult Japanese patients with dilated cardiomyopathy, *Circ J* 69 [2], Seite 150-3.
- [115] Suzuki, M.; Carlson, K. M.; Marchuk, D. A. und Rockman, H. A. (2002): Genetic modifier loci affecting survival and cardiac function in murine dilated cardiomyopathy, *Circulation* 105 [15], Seite 1824-9.
- [116] Chien, K. R. (1999): Stress pathways and heart failure, *Cell* 98 [5], Seite 555-8.

- [117] Watkins, H.; Rosenzweig, A.; Hwang, D. S.; Levi, T.; McKenna, W.; Seidman, C. E. und Seidman, J. G. (1992): Characteristics and prognostic implications of myosin missense mutations in familial hypertrophic cardiomyopathy, *N Engl J Med* 326 [17], Seite 1108-14.
- [118] Charron, P.; Dubourg, O.; Desnos, M.; Bennaceur, M.; Carrier, L.; Camproux, A. C.; Isnard, R.; Hagege, A.; Langlard, J. M.; Bonne, G.; Richard, P.; Hainque, B.; Bouhour, J. B.; Schwartz, K. und Komajda, M. (1998): Clinical features and prognostic implications of familial hypertrophic cardiomyopathy related to the cardiac myosin-binding protein C gene, *Circulation* 97 [22], Seite 2230-6.
- [119] Marian, A. J. und Roberts, R. (2001): The molecular genetic basis for hypertrophic cardiomyopathy, *J Mol Cell Cardiol* 33 [4], Seite 655-70.
- [120] Villard, E.; Duboscq-Bidot, L.; Charron, P.; Benaiche, A.; Conraads, V.; Sylvius, N. und Komajda, M. (2005): Mutation screening in dilated cardiomyopathy: prominent role of the beta myosin heavy chain gene, *Eur Heart J* 15, Seite 15.
- [121] Herskowitz, I. (1987): Functional inactivation of genes by dominant negative mutations, *Nature* 329 [6136], Seite 219-22.
- [122] Rayment, I.; Holden, H. M.; Sellers, J. R.; Fananapazir, L. und Epstein, N. D. (1995): Structural interpretation of the mutations in the beta-cardiac myosin that have been implicated in familial hypertrophic cardiomyopathy, *Proc Natl Acad Sci U S A* 92 [9], Seite 3864-8.
- [123] Geisterfer-Lowrance, A. A.; Christe, M.; Conner, D. A.; Ingwall, J. S.; Schoen, F. J.; Seidman, C. E. und Seidman, J. G. (1996): A mouse model of familial hypertrophic cardiomyopathy, *Science* 272 [5262], Seite 731-4.
- [124] Fatkin, D.; Christe, M. E.; Aristizabal, O.; McConnell, B. K.; Srinivasan, S.; Schoen, F. J.; Seidman, C. E.; Turnbull, D. H. und Seidman, J. G. (1999): Neonatal cardiomyopathy in mice homozygous for the Arg403Gln mutation in the alpha cardiac myosin heavy chain gene, *J Clin Invest* 103 [1], Seite 147-53.
- [125] McConnell, B. K.; Jones, K. A.; Fatkin, D.; Arroyo, L. H.; Lee, R. T.; Aristizabal, O.; Turnbull, D. H.; Georgakopoulos, D.; Kass, D.; Bond, M.; Niimura, H.; Schoen, F. J.; Conner, D.; Fischman, D. A.; Seidman, C. E. und Seidman, J. G. (1999): Dilated cardiomyopathy in homozygous myosin-binding protein-C mutant mice, *J Clin Invest* 104 [9], Seite 1235-44.
- [126] Karkkainen, S.; Helio, T.; Jaaskelainen, P.; Miettinen, R.; Tuomainen, P.; Ylitalo, K.; Kaartinen, M.; Reissell, E.; Toivonen, L.; Nieminen, M. S.; Kuusisto, J.; Laakso, M. und Peuhkurinen, K. (2004): Two novel mutations in the beta-myosin heavy chain gene associated with dilated cardiomyopathy, *Eur J Heart Fail* 6 [7], Seite 861-8.
- [127] Li, D.; Czernuszewicz, G. Z.; Gonzalez, O.; Tapscott, T.; Karibe, A.; Durand, J. B.; Brugada, R.; Hill, R.; Gregoritch, J. M.; Anderson, J. L.; Quinones, M.; Bachinski, L. L. und Roberts, R. (2001): Novel cardiac troponin T mutation as a cause of familial dilated cardiomyopathy, *Circulation* 104 [18], Seite 2188-93.
- [128] Stefanelli, C. B.; Rosenthal, A.; Borisov, A. B.; Ensing, G. J. und Russell, M. W. (2004): Novel troponin T mutation in familial dilated cardiomyopathy with gender-dependant severity, *Mol Genet Metab* 83 [1-2], Seite 188-96.
- [129] Hanson, E. L.; Jakobs, P. M.; Keegan, H.; Coates, K.; Bousman, S.; Diemel, N. H.; Litt, M. und Hershberger, R. E. (2002): Cardiac troponin T lysine 210 deletion in a family with dilated cardiomyopathy, *J Card Fail* 8 [1], Seite 28-32.
- [130] Gille, C. und Frömmel, C. (2001): STRAP: editor for STRuctural Alignments of Proteins, *Bioinformatics* 17 [4], Seite 377-8.
- [131] Srikakulam, R. und Winkelmann, D. A. (1999): Myosin II folding is mediated by a molecular chaperonin, *J Biol Chem* 274 [38], Seite 27265-73.
- [132] Schönberger, J. und Seidman, C. E. (2001): Many roads lead to a broken heart: the genetics of dilated cardiomyopathy, *Am J Hum Genet* 69 [2], Seite 249-60.

- [133] Baig, M. K.; Goldman, J. H.; Caforio, A. L.; Coonar, A. S.; Keeling, P. J. und McKenna, W. J. (1998): Familial dilated cardiomyopathy: cardiac abnormalities are common in asymptomatic relatives and may represent early disease, *J Am Coll Cardiol* 31 [1], Seite 195-201.
- [134] Poole-Wilson, P. A.; Swedberg, K.; Cleland, J. G.; Di Lenarda, A.; Hanrath, P.; Komajda, M.; Lubsen, J.; Lutiger, B.; Metra, M.; Remme, W. J.; Torp-Pedersen, C.; Scherhag, A. und Skene, A. (2003): Comparison of carvedilol and metoprolol on clinical outcomes in patients with chronic heart failure in the Carvedilol Or Metoprolol European Trial (COMET): randomised controlled trial, *Lancet* 362 [9377], Seite 7-13.
- [135] (1992): The SOLVD Investigators. Effect of enalapril on mortality and the development of heart failure in asymptomatic patients with reduced left ventricular ejection fractions., *N Engl J Med* 327 [10], Seite 685-91.
- [136] Waagstein, F.; Bristow, M. R.; Swedberg, K.; Camerini, F.; Fowler, M. B.; Silver, M. A.; Gilbert, E. M.; Johnson, M. R.; Goss, F. G. und Hjalmarson, A. (1993): Beneficial effects of metoprolol in idiopathic dilated cardiomyopathy. Metoprolol in Dilated Cardiomyopathy (MDC) Trial Study Group, *Lancet* 342 [8885], Seite 1441-6.
- [137] Hosenpud, J. D.; Bennett, L. E.; Keck, B. M.; Boucek, M. M. und Novick, R. J. (2000): The Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: seventeenth official report-2000, *J Heart Lung Transplant* 19 [10], Seite 909-31.

7 Anhang

7.1 Verzeichnis verwendeter Abkürzungen

ABCC9	ATP-Binding-Cassette C9-Gen
ACE	Angiotensin-Converting Enzym
ACTC	Kardiales α -Aktin-Gen
ADP	Adenosindiphosphat
APS	Ammoniumpersulfat
ARVCM	Arrhythmogene Rechtsventrikuläre Kardiomyopathie
AT ₁	Angiotensin II Typ-1 Rezeptor
ATP	Adenosintriphosphat
β -MHC	β -Myosin Heavy Chain
bp	Basenpaar
BSA	Bovines Serumalbumin
Ca ²⁺	Calcium
COMET	Carvedilol or Metoprolol European Trial
CSRP3	Cystein Rich Protein 3-Gen
DAG	Dystrophin-assoziierter Glykoproteinkomplex
dATP	Desoxy-Adenosintriphosphat
DCM	Dilatative Kardiomyopathie
dCTP	Desoxy-Cytidintriphosphat
ddNTP	Didesoxy-Nukleotidtriphosphat
del	Deletion
DES	Desmin-Gen
dGTP	Desoxy-Guanosintriphosphat
DMD	Dystrophin-Gen
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleic Acid
dNTP	Desoxy-Nukleotidtriphosphat
dTTP	Desoxy-Thymidintriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetylsäure
EKG	Elektrokardiographie
EYA4	Eyes Absent 4-Gen
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
g	Gramm
HCl	Salzsäure
HCM	Hypertrophe Kardiomyopathie

ICD	Implantierbarer Cardioverter-Defibrillator
ISFC	International Society and Federation of Cardiology Task Force
IVS	Intervening Sequence
kDa	Kilodalton
Kir6.2	K ⁺ Channel Inward Rectifying 6.2
KO	Körperoberfläche
LDB3	LIM Domain Binding 3-Gen
LIM	Lin-11, Isl-1, Mec-3
LMM	Light Meromyosin
LMNA	Lamin A/C-Gen
LOD	Logarithm of the Odds
LVEDD	Linksventrikulärer Enddiastolischer Durchmesser
LVEF	Linksventrikuläre Ejektionsfraktion
LVEDS	Linksventrikulärer Endsystolischer Durchmesser
M	Molar
Min	Minute
ml	Milliliter
μl	Mikroliter
MLC	Myosin Light Chain
MLP	Muskel-LIM-Protein(-Gen)
mM	Millimolar
mm	Millimeter
mmHg	Millimeter Quecksilber
mRNA	Messenger Ribonucleic Acid
MYBPC3	Myosin-Bindungsprotein C-Gen
MYH7	β-MHC-Gen
MYL2	Myosin Light Chain 2-Gen
MYL3	Myosin Light Chain 3-Gen
n	Anzahl
Na ⁺	Natrium
ng	Nanogramm
NKCM	Nicht Klassifizierbare Kardiomyopathie
nm	Nanometer
NYHA	New York Heart Association
PAPm	Mittlerer Pulmonalarteriendruck
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDZ	PSD-95, DLG-A, ZO-1

PLN	Phospholamban-Gen
pmol	Pikomol
RCM	Restriktive Kardiomyopathie
RFLP	Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus
RNA	Ribonucleic Acid
rpm	Rounds per Minute
SCN5A	Natrium-Kanal 5 α (-Gen)
SDS	Sodium-Dodecyl-Sulfate
Sek	Sekunde
SGCD	δ -Sarcoglycan-Gen
SOLVD	Studies of Left Ventricular Dysfunction
SSCP	Single-Strand-Conformation-Polymorphism
STRAP	Structural Alignment of Proteins
SUR2A	Sulfonylharnstoff-Rezeptor 2A
Taq	Thermus aquaticus
TAZ	Tafazzin-Gen
TBE	Tris-Borat-EDTA
TCAP	Titin-Cap-Gen
TE	Tris-HCl-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TMHA	Temperatur-modulierte Heteroduplexanalyse
TNNC1	Kardiales Troponin C-Gen
TNNI3	Kardiales Troponin I-Gen
TNNT2	Kardiales Troponin T-Gen
TPM1	α -Tropomyosin-Gen
Tris	Trishydroxy-methylaminomethan
tRNA	Transfer Ribonucleic Acid
TTN	Titin-Gen
U	Unit
VCL	Metavinculin-Gen
VF	Verkürzungsfraction
WHO	World Health Organization
ZASP	Z-Band Alternatively Spliced PDZ Motif-Containing Protein (-Gen)

7.2 Verzeichnis der Abbildungen

Abbildung 1-1: Schematische Darstellung der involvierten Proteine bei DCM	5
Abbildung 1-2: Schematische Darstellung des Sarkomers	7
Abbildung 3-1: Lokalisation der Varianten im β -MHC-Gen	32
Abbildung 3-2: Variante Ala223Thr (g.7799G>A)	33
Abbildung 3-3: Alignment β -MHC Ala223	34
Abbildung 3-4: Variante Ser642Leu (g.12164C>T).....	35
Abbildung 3-5: Alignment Ser642.....	35
Abbildung 3-6: STRAP-Analyse der Mutationen im β -MHC-Gen.....	36
Abbildung 3-7: DNA-Sequenzierung der Variante IVS11+23A>T (g.8914A>T)	37
Abbildung 3-8: Variante Asp376Asp (g.9666C>T).....	38
Abbildung 3-9: Variante IVS2-25G>T (g.5688G>T).....	38
Abbildung 3-10: DNA-Sequenzierung der Variante IVS2-25G>T (g.5688G>T).....	39
Abbildung 3-11: Variante Thr63Thr (g.5909C>T).....	40
Abbildung 3-12: DNA-Sequenzierung der Variante Thr63Thr (g.5909C>T)	40
Abbildung 3-13: Variante Phe244Phe (g.7864C>T).....	41
Abbildung 3-14: DNA-Sequenzierung der Variante Phe244Phe (g.7864C>T).....	41
Abbildung 3-15: Variante Asp325Asp (g.8867C>T).....	42
Abbildung 3-16: Variante Gly354Gly (g.9600C>T).....	42
Abbildung 3-17: RFLP-Analyse der Variante Gly354Gly (g.9600C>T).....	43
Abbildung 3-18: Variante Lys365Lys (g.9633G>A).....	43
Abbildung 3-19: Lokalisation der Polymorphismen im Troponin T-Gen.....	47
Abbildung 3-20: Variante IVS3-11_IVS3-7dupCTTCT (g.6361_6365dupCTTCT)	47
Abbildung 3-21: DNA-Sequenzierung der Variante IVS3-11_IVS3-7dupCTTCT	48
Abbildung 3-22: Variante IVS5-50G>A (g.10553G>A).....	48
Abbildung 3-23: DNA-Sequenzierung der Variante IVS5-50G>A (g.10553G>A)	49
Abbildung 3-24: Variante Ser69Ser (g.12739G>A).....	49
Abbildung 3-25: Variante Ile106Ile (g.13150T>C).....	50
Abbildung 3-26: DNA-Sequenzierung der Variante Ile106Ile (g.13150T>C)	51
Abbildung 3-27: Variante IVS11-32C>A (g.15978C>A)	51
Abbildung 3-28: DNA-Sequenzierung der Variante IVS11-32C>A (g.15978C>A).....	52
Abbildung 3-29: Variante IVS14-33C>T (g.18708C>T)	52
Abbildung 3-30: RFLP-Analyse der Variante IVS14-33C>T (g.18708C>T).....	53

7.3 Verzeichnis der Tabellen

Tabelle 1-1: Bekannte Gene der dilatativen Kardiomyopathie.....	13
Tabelle 2-1: Primerpaare für die Mutationssuche im β -MHC-Gen.....	20
Tabelle 2-2: Primerpaare für die Mutationssuche im Troponin T-Gen.....	21
Tabelle 2-3: Standard-Protokoll für die PCR-Reaktion	22
Tabelle 2-4: Standard-Protokoll für die Sequenzierungsreaktion.....	25
Tabelle 2-5: Restriktionsendonukleasen für die RFLP-Analyse.....	26
Tabelle 3-1: Klinische Daten der 46 Patienten	29
Tabelle 3-2: Identifizierte Mutationen und Polymorphismen im β -MHC-Gen.....	31
Tabelle 3-3: β -MHC-Gen: Hardy-Weinberg-Gleichgewicht des DCM-Kollektivs (n = 46).....	44
Tabelle 3-4: β -MHC-Gen: Vergleich der Allel- und Genotypfrequenzen bei DCM und HCM	45
Tabelle 3-5: Identifizierte Polymorphismen im Troponin T-Gen.....	46
Tabelle 3-6: Troponin T-Gen: Hardy-Weinberg-Gleichgewicht des DCM-Kollektivs (n = 46).....	54
Tabelle 3-7: Troponin T-Gen: Vergleich der Allel- und Genotypfrequenzen bei DCM und HCM	54
Tabelle 4-1: Codon usage der stummen Varianten im β -MHC- und Troponin T-Gen	58
Tabelle 4-2: Alle bekannten DCM-Mutationen in Sarkomerprotein-Genen.....	64

7.4 Danksagung

Meiner Doktormutter Frau Prof. Dr. Vera Regitz-Zagrosek danke ich für die Überlassung des vorliegenden Dissertationsthemas und das in mich gesetzte Vertrauen. Sie ermöglichte mir, selbstständig und eigenverantwortlich in ihrem Forschungslabor experimentell zu arbeiten und dadurch einen Beitrag für ihre Arbeitsgruppe zu leisten. Frau Prof. Dr. Regitz-Zagrosek war stets an den Ergebnissen meiner Arbeit interessiert, gab wertvolle Anregungen und förderte zu jeder Zeit meinen wissenschaftlichen Werdegang. Sie ermöglichte mir die Teilnahme an Kongressen und die Präsentation eines Vortrags. Dafür meinen herzlichen Dank.

Frau PD Dr. Jeanette Erdmann möchte ich für ihre stetige fachliche und persönliche Unterstützung danken. Mit ihrer großen Hilfsbereitschaft, der konstruktiven Kritik und nicht zuletzt der kritischen Durchsicht der Dissertationsschrift hat sie mich auch in schwierigen Phasen der Arbeit immer begleitet. Sie hat mein Bild von der wissenschaftlichen Forschung geprägt. Ihre freundschaftliche Art und Begeisterung für die Genetik haben mein wissenschaftliches Interesse nachhaltig gefördert.

Frau Heike Kallisch danke ich für die intensive Einarbeitung in die Techniken der Molekulargenetik. Ihr Erfahrungsreichtum, die engagierten Hilfestellungen und zahlreichen Ratschläge zu Beginn der Laborarbeit waren überaus hilfreich.

Herrn Prof. Dr. Cornelius Frömmel und Herrn Dr. Christoph Gille aus dem Institut für Biochemie danke ich für die Erstellung der STRAP-Analyse und die gute Zusammenarbeit.

Frau Tania Schink aus dem Institut für Medizinische Biometrie danke ich für ihre Unterstützung bei der statistischen Auswertung.

Andreas Oehme möchte ich für seine moralische Unterstützung und die geduldige Hilfe beim Layout meiner Arbeit danken.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern und Großeltern, die mir durch ihre jahrelange uneingeschränkte Unterstützung mein Studium und die Anfertigung dieser Dissertation ermöglicht haben.

7.5 Lebenslauf

Name Steffen Dähmlow
 Geburtsdatum 22. August 1976
 Geburtsort Ulm
 Staatsangehörigkeit deutsch

Schulbildung

1983 - 1996 Grundschule Ulm-Unterweiler und Humboldt-Gymnasium Ulm
 1996 Abitur in den Fächern Latein, Mathematik, Geschichte und Sport, Note 1,8

Zivildienst

1996 - 1997 Zivildienst beim Deutschen Roten Kreuz in Ulm mit Ausbildung zum Rettungshelfer

Hochschulbildung

10/1997 - 12/2004 Studium der Humanmedizin an der Freien Universität Berlin und Charité – Universitätsmedizin Berlin

Ärztliche Prüfungen

09/1999 Ärztliche Vorprüfung
 08/2000 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
 09/2003 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
 12/2004 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
 Ärztliche Prüfung, Gesamtnote 1,16

Famulaturen

03/2000 Innere Medizin - Auguste-Viktoria-Krankenhaus Berlin
 08/2001 - 09/2001 Kinderkardiologie - Deutsches Herzzentrum Berlin
 02/2002 - 03/2002 Pädiatrie - Praxis Dr. Jäger-Roman / Dr. Singendonk, Berlin
 09/2002 - 10/2002 Pädiatrie - Children's Hospital New Orleans der Louisiana State University, Department of Genetics

Praktisches Jahr

10/2003 - 02/2004 Pädiatrie - Charité – Universitätsmedizin Berlin
 02/2004 - 06/2004 Innere Medizin - Charité – Universitätsmedizin Berlin
 06/2004 - 09/2004 Chirurgie - Universitätsspital Zürich

Promotion

01/2001 Beginn der Promotionsarbeit am Deutschen Herzzentrum Berlin und der Charité Berlin bei Frau Prof. Regitz-Zagrosek

Berufliche Tätigkeit

04/2000 - 03/2003 Studentischer Tutor am Institut für Molekularbiologie und Biochemie der Freien Universität Berlin bei Herrn Prof. Reutter
 seit 07/2005 Wissenschaftlicher Mitarbeiter der Klinik für Allgemeine Pädiatrie der Charité – Universitätsmedizin Berlin bei Herrn Prof. Gaedicke

Berlin, 27.09.2005

7.6 Publikationen

Originalarbeiten

1. Daehmlow S, Erdmann J, Knueppel T, Gille C, Froemmel C, Hummel M, Hetzer R, Regitz-Zagrosek V. Novel mutations in sarcomeric protein genes in dilated cardiomyopathy. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;298:116-120.
2. Erdmann J, Daehmlow S, Wischke S, Senyuva M, Werner U, Raible J, Tanis N, Dyachenko S, Hummel M, Hetzer R, Regitz-Zagrosek V. Mutation spectrum in a large cohort of unrelated consecutive patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Clin Genet* 2003;64:339-349.
3. Erdmann J, Dähmlow S, Guse M, Hetzer R, Regitz-Zagrosek V. The assertion that a G21V mutation in AGTR2 causes mental retardation is not supported by other studies. *Hum Genet* 2004;114:396.

Kongress-Beiträge

1. Regitz-Zagrosek V, Daehmlow S, Knueppel T, Kotsch K, Gille C, Froemmel C, Elsner A, Hummel M, Hetzer R. Novel mutations in the β myosin heavy chain (β MHC) and myosin binding protein C (MYBPC) gene are associated with dilated cardiomyopathy. *Circulation* 2001;104:II-572.
2. Erdmann J, Dähmlow S, Knüppel T, Wischke S, Senyuva M, Werner U, Raible J, Tanis N, Hummel M, Hetzer R, Regitz-Zagrosek V. Überblick über das Mutationspektrum in MYBPC3, MYH7, TNNT2, TPM1, TNNI3 und TNNC1 bei 108 Patienten mit hypertropher Kardiomyopathie. *Z Kardiol* 2002;91:I-101.
3. Dähmlow S, Knüppel T, Erdmann J, Gille C, Froemmel C, Hummel M, Hetzer R, Regitz-Zagrosek V. Neue Mutationen im β Myosin Gen (β MHC) und im Myosin Bindungsprotein C (MYBPC) Gen sind mit dilatativer Kardiomyopathie assoziiert. *Z Kardiol* 2002;91:I-266.
4. Erdmann J, Dähmlow S, Werner U, Senyuva M, Tanis N, Hummel M, Hetzer R, Regitz-Zagrosek V. MYBPC3 not MYH7 is the predominant gene mutated in a large cohort of unrelated consecutive patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Eur Heart J* 2002;4:119.
5. Erdmann J, Dähmlow S, Knüppel T, Frömmel C, Gille C, Elsner A, Hetzer R, Regitz-Zagrosek V. Novel mutations in the beta myosin heavy chain (β MHC) and myosin binding protein C (MYBPC3) gene are associated with dilated cardiomyopathy. *Eur Heart J* 2002;4:278.
6. Dähmlow S, Erdmann J, Senyuva M, Hummel M, Hetzer R, Tanis N, Werner U, Regitz-Zagrosek V. MYPBC3 not MYH7 is the predominant gene mutated in a large cohort of unrelated consecutive patients in hypertrophic cardiomyopathy. *Medgen* 2002;14:349.

7.7 Eidesstattliche Erklärung

Ich, Steffen Dähmlow, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: Mutationen und Polymorphismen im β -MHC- und Troponin T-Gen bei Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.

Berlin, 27.09.2005