

Aus der Klinik für Herz-, Thorax- und Gefäßchirurgie
des Deutschen Herzzentrums Berlin
Stiftung des Bürgerlichen Rechts

DISSERTATION

**Genetische Variabilität im Myosin Bindungsprotein C3
und im Alpha-Tropomyosin
bei Patienten mit Dilatativer Kardiomyopathie**

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin
Berlin

von

Tanja Knüppel

aus Berlin

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. V. Regitz-Zagrosek
2. Prof. Dr. med B. Pieske
3. Prof. Dr. Chr. Hengstenberg

Datum der Promotion: 1. September 2006

Publikationen

Originalpublikation

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. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2002; 298: 116-120.

Publizierte Abstracts

Knueppel, T.; Schaefer, F.; Weber, S. und NEPHROGEN-Projektpartner: NEPHROGEN: Online-Portal zur Diagnostik genetischer Nephropathien. 36. Tagung der Arbeitsgemeinschaft für Pädiatrische Nephrologie, Hannover, 21.-23.3.2005; *Nieren- und Hochdruckerkrankungen* 2005; 34/4: 173; PE9 (Abstract).

Berger, A.; Weber, T.; Knueppel, T.; Jankauskiené, A.; Peco-Antic, A.; Tasic, V.; Wühl, E.; Konrad, M.; Kemper, M.; Müller-Wiefel, D. E.; Schaefer, F.; Weber, S.: Mutationsinzidenz in EYA1 und PAX2 in einer unselektierten Kohorte von 135 Kindern mit kongenitalen Fehlbildungen der Nieren und der ableitenden Harnwege (CAKUT). 36. Tagung der Arbeitsgemeinschaft für Pädiatrische Nephrologie, Hannover, 21.-23.3.2005; *Nieren- und Hochdruckerkrankungen* 2005; 34/4: 190-191; PP13 (Abstract).

Höcker, B.; Knueppel, T.; Schaefer, F.; Tönshoff, B.: Rezidiv einer fokal-segmentalen Glomerulosklerose (FSGS) im Nierentransplantat nach Umstellung der Immunsuppression von Cyclosporin A (CsA) auf Sirolimus (SRL). 36. Tagung der Arbeitsgemeinschaft für Pädiatrische Nephrologie, Hannover, 21.-23.3.2005; *Nieren- und Hochdruckerkrankungen* 2005; 34/4: 160; PB08 (Abstract).

Schönfelder, E.; Knueppel, T.; Wühl, E.; Tasic, V.; Miljkovic, P.; Konrad, M.; Antignac, C.; Bakkaloglu, A.; Schaefer, F.; Weber, S. and members of the ESCAPE trial study group: Mutations in human uroplakin IIIA are a rare cause of congenital anomalies of the kidney and urinary tract (CAKUT). ESPN, Istanbul, 2005; *Pediatric Nephrology* 2005; 20/9: C31, OC-41 (Abstract).

Höcker, B.; Knueppel, T.; Weber, S.; Schaefer, F.; Tönshoff, B.: Recurrence of Focal-Segmental Glomerulosclerosis in a Renal Allograft 10 Years posttransplant after Conversion from Cyclosporin A to Sirolimus. ESPN, Istanbul, 2005; *Pediatric Nephrology* 2005; 20/9: C46; PP-073 (Abstract).

Knueppel, T.; Keuerleber, D.; Zipfel, P.F.; Schaefer, F.: E. coli 0157-associated Haemolytic Uremic Syndrome (HUS) in a Patient with Complement Factor H Gene Mutation. ESPN, Istanbul, 2005; *Pediatric Nephrology* 2005; 20/9: C81; PP-283 (Abstract).

Knueppel, T.; Weber, S.; Kirschfink, M.; Schumacher, V.; Royer-Pokora, B.; Bergmann, C.; Zerres, K.; Zipfel, P. F.; Sonntag, A.-K.; Karch, H.; Konrad, M.; Jeck, N.; Schlingmann, K.P.; Seyberth, H.; Schaefer, F.: NEPHROGEN: On-line portal for diagnostic of genetic nephropathies. ESPN, Istanbul, 2005; *Pediatric Nephrology* 2005; 20/9: C82; PP-284 (Abstract).

Knueppel, T.; Weber, S.; Schumacher, V.; Royer-Pokora, B.; Bergmann, C.; Zerres, K.; Zipfel, P.F.; Konrad, M.; Jeck, N.; Seyberth, H.; Karch, H. und Schaefer, F.: NEPHROGEN: Online-Portal zur Diagnostik genetischer Nephropathien. 101. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kinder- und Jugendmedizin, Bremen, 29.9.-02.10.2005; *Monatszeitschrift für Kinderheilkunde* 2005; 153: Suppl 2, K024.01P (Abstract).

Für meine Familie

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Der Herzmuskel	1
1.2	Klassifikation der Kardiomyopathien	2
1.3	Dilatative Kardiomyopathie	3
1.3.1	Genetik der Dilatativen Kardiomyopathie	5
1.4	Bedeutung der Kandidatengene	10
1.4.1	Funktion des α -Tropomyosins	10
1.4.2	Funktion des Myosin-Bindungsprotein C 3	11
1.5	Zielstellung der Arbeit	12
2	Material und Methoden	13
2.1	Patienten und Kontrollkollektive	13
2.2	Materialien	13
2.2.1	Geräte	13
2.2.2	Chemikalien	14
2.2.2.1	DNA-Aufarbeitung	14
2.2.2.2	Polymerasekettenreaktion (PCR)	14
2.2.2.3	Agarose-Gele	14
2.2.2.4	SSCP-Gele	15
2.2.2.5	RFLP-Analyse	15
2.2.3	Enzyme und Längenstandards	15
2.2.3.1	Polymerasekettenreaktion (PCR)	15
2.2.3.2	RFLP-Analyse	15
2.2.4	Sonstiges	15
2.2.4.1	SSCP-Analyse	15
2.2.4.2	Sequenzierung	15
2.2.5	Synthetische Oligonukleotide (Primer)	16
2.3	Methoden	18
2.3.1	Methodischer Überblick	18
2.3.2	Isolierung und Aufarbeitung der DNA	19
2.3.3	Genamplifikation mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion (PCR)	19
2.3.4	Agarosegel-Elektrophorese	21
2.3.5	Einzelstrangkonformationsanalyse (SSCP-Analyse)	21
2.3.6	DNA-Sequenzierung	23
2.3.7	Restriktionsfragment-Längen-Polymorphismus- (RFLP-) Analyse	25
2.3.8	Statistische Methoden	26
3	Ergebnisse	28
3.1	Mutationen im <i>MYBPC3</i> -Gen	28
3.1.1	A536A (Exon 17)	29
3.1.2	A774T (Exon 24)	29

3.1.3	D880E (Exon 26)	31
3.1.4	N948T (Exon 27)	34
3.2	Polymorphismen im <i>MYBPC3</i> -Gen	35
3.2.1	Exon 6, 4229 A>G; S236G	36
3.2.2	Exon 7, 4825 C>T; T262T	37
3.2.3	Exon 12, 6396 G>A; R326Q	38
3.2.4	IVS 12-24, C>T	39
3.2.5	IVS 21+38, A>T	40
3.2.6	IVS 23+8, C>G	41
3.2.7	IVS 33-66, C>T	42
3.2.8	IVS 33-91, G>A	44
3.3	Mutationssuche im <i>Alpha-Tropomyosin</i> -Gen	45
4	Diskussion	46
4.1	<i>MYBPC3</i> als Kandidatengen	46
4.1.1	Aufbau des Myosin-Bindungsprotein C 3	46
4.1.2	Mutationen im <i>MYBPC3</i> sind verantwortlich für die HCM	48
4.1.3	Bedeutung der Mutation A774T im Exon 24	49
4.1.4	Bedeutung der Mutation D880E im Exon 26	50
4.1.5	Bedeutung der Mutation N948T im Exon 27	51
4.1.6	Die Bedeutung von stummen Mutationen in der Krankheitsentwicklung	52
4.2	Rolle der Polymorphismen im <i>MYBPC3</i> bei der DCM	53
4.3	<i>Alpha-Tropomyosin</i> als Kandidatengen	54
4.4	Mutationen in Sarkomerproteinen als Krankheitsursache der DCM	55
4.5	Hypothesen der Entstehung der Idiopathischen DCM	57
5	Zusammenfassung	59
6	Appendix	61
6.1	Genetik im Überblick	61
6.2	Verzeichnis der Tabellen	63
6.3	Verzeichnis der Abbildungen	64
7	Literaturverzeichnis	65
8	Danksagung	75
9	Lebenslauf	76
10	Erklärung an Eides Statt	77

Abkürzungen

A	Adenin
Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumpersulfat
Aqua ad inject.	Aqua ad injectabilia
AS	Aminosäure
β -MHC	Beta-myosin heavy chain (Schwere Mysinkette vom Typ β)
Bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
C	Cytosin
DCM	Dilatative Cardiomyopathie
DHZB	Deutsches Herzzentrum Berlin
DNA	Desoxy ribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	Desoxyribonukleotid-5`-Triphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetylsäure
G	Guanin
g	Gramm
h	Stunde
HCL	Salzsäure
HCM	Hypertrophe Cardiomyopathie
kB	Kilobase
KCL	Kaliumchlorid
kDA	Kilodalton
KHCO ₃	Kaliumhydrogencarbonat
M	Molarität
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minute
ml	Milliliter
mRNA	Messenger ribonucleic acid (Boten-RNA)
μ g	Mikrogramm
μ l	Mikroliter

MYBPC3	Myosin-Bindungsprotein C 3
NaCl	Natriumchlorid
ng	Nanogramm
NH ₄ Cl	Ammoniumchlorid
PAA	Polyacrylamid
PCR	Polymerase chain reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
pmol	Picomol
RNA	Ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
sek	Sekunden
SSCP	Single-strand conformation polymorphism (Einzelstrang-Konformationspolymorphismus)
T	Thymin
Tab.	Tabelle
Taq	Thermus aquaticus
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TPM1	Alpha-Tropomyosin 1
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
U	Unit (Einheit)
rpm	Rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
UV-Licht	ultraviolettes Licht
V	Volt

5 Zusammenfassung

Es wird angenommen, dass Mutationen in Sarkomergenen in bis zu 10% die Ursache einer familiären DCM darstellen.

Eines der Ziele dieser Dissertation war es in einer Kohorte von 46 unverwandten Patienten mit idiopathischer DCM (IDC) Varianten in den Sarkomerproteinen MYBPC3 und TPM1 zu identifizieren.

Zu diesem Zweck wurde aus dem Vollblut der Patienten DNA extrahiert und anschließend das entsprechende Fragment mittels PCR amplifiziert. Das Amplifikat wurde denaturiert und einer SSCP-Analyse und gegebenenfalls Sequenzierung zugeführt.

Mutationen im Sarkomerprotein MYBPC3 wurden bisher nur bei Patienten mit HCM als Krankheitsursache gefunden.

Im Rahmen dieser Arbeit konnten erstmalig bei Patienten mit IDC Mutationen im *MYBPC3*- Gen identifiziert werden.

Es wurden bei vier verschiedenen Patienten unterschiedliche heterozygote Mutationen (A774T, D880E, N948T und A536A) gefunden. Bei allen Mutationen handelt es sich um Basenaustausche. Drei der Patienten weisen eine Mutation auf, die zu einem Basenaustausch führt, der wiederum die Ursache einer Aminosäuresubstitution darstellt. Diese Form der Punktmutation wird als Missense-Mutation bezeichnet. Die Position A774 ist partiell konserviert, während die Aminosäuren an Position 880 und 948 in einer konservierten Domäne liegen. Der vierte Patient zeigt eine stumme Mutation, bei der der Basenaustausch nicht zu einer Aminosäuresubstitution führt.

Die drei Aminosäuresubstitutionen befinden sich in derselben Domäne des MYBPC3. Diese Region befindet sich am C-terminalen Ende des Proteins und ist für die Interaktion mit dem A-Band verantwortlich. Es wird angenommen, dass diese Interaktion eine wichtige Funktion in der Regulation der Kontraktion und deren Weiterleitung an das Zytoskelett wahrnimmt. Es ist daher sehr wahrscheinlich, dass die Mutationen die Regulation der Kontraktion negativ beeinflussen und so zu einer Abnahme der Kontraktionsstärke führen. Dieses führt dann vermutlich über einen bisher unbekanntem Mechanismus zu einer DCM.

Eine der Aminosäuresubstitutionen (N948T) wurde von uns publiziert (Daehmlow, S. et. al. (2002)), die übrigen Mutationen sind in der Literatur bisher nicht beschrieben. Sie wurden weder in 100 gesunden Kontrollen identifiziert, noch in HCM-Patienten bisher gefunden.

Neben den oben beschriebenen Mutationen konnten acht bekannte Polymorphismen im MYBPC3 identifiziert und ausgewertet werden. Die Genotypenverteilung sowohl des Patienten- als auch des Kontrollkollektives entsprach einer Mendelschen Normalverteilung. Aufgrund der nicht signifikant abweichenden Allelfrequenzen zwischen beiden Kohorten ergaben sich keinerlei Anhaltspunkte dafür, dass die im MYBPC3 identifizierten Polymorphismen eine Relevanz in der Krankheitsentstehung aufweisen.

Keiner der Patienten in der Studienkohorte zeigte Mutationen im *TPMI*-Gen, was am wahrscheinlichsten durch die im Vergleich zur Häufigkeit von Mutationen in diesem Gen zu kleine Kohortengröße bedingt sein könnte.

9 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Tanja Knüppel
 Geburtsdatum/-ort: 26. März 1977, Berlin
 Familienstand: ledig
 Nationalität: deutsch

Schulbildung

1983-1989 Alfred-Brehm-Grundschule, Berlin
 1989-1993 Max-Beckmann-Oberschule, Berlin
 1993-1994 Bloomfield High School, New Mexico, USA
 1994-1996 Max-Beckmann-Oberschule, Berlin
 Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Hochschulbildung

1997-2003 Freie Universität Berlin: Humanmedizin
 1999 Ärztliche Vorprüfung
 2000 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
 2002 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
 29.4.- 18.8.02 Erstes Tertial: Innere Medizin am Kantonsspital Basel
 19.8.- 08.12.02 Zweites Tertial: Pädiatrie am Universitätsklinikum Rudolf Virchow in Berlin
 09.12.02- 02.03.03 Drittes Tertial: Kinder- und Allgemein Chirurgie am Kantonsspital Luzern
 2003 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Famulaturen

19.07. –19.09.1999 Allgemein-, Gefäß- und Thoraxchirurgie der Freien Universität Berlin
 31.07. –29.08.2000 Kinderklinik der Freien Universität Berlin, Abteilung für Neonatologie
 23.07. –22.08.2001 Karin Bischoff, Praxis für Allgemeinmedizin
 27.08. –23.09.2001 Pädiatrische Hämatologie und Onkologie an der Universität Illinois in Chicago

Dissertation

20.03.2001 Beginn der Arbeit an der vorliegenden Dissertation am Deutschen Herzzentrum Berlin unter der Leitung von Prof. Dr. V. Regitz-Zagrosek; Thema: „Genetische Variabilität im Myosin Bindungsprotein C3 und im Alpha-Tropomyosin bei Patienten mit Dilatativer Kardiomyopathie“

Ärztin im Praktikum/ Assistenzärztin

Seit 01.10.03 Universitätsklinik Heidelberg, Klinik für Kinder- und Jugendmedizin, Sektion für Pädiatrische Nephrologie