

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 *TPM1*-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