

3 Ergebnisse

3.1 Mutationen im MYBPC3-Gen

Bei einem Patientenkollektiv von insgesamt 46 unverwandten Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie (DCM) wurde eine systematische Mutationssuche im Gen des MYBPC3 durchgeführt. Zu diesem Zweck wurde aus den Blutproben der Patienten zunächst die DNA extrahiert, im Anschluss daran wurden die einzelnen Exone des Gens mittels PCR amplifiziert. Bei den entstandenen Amplifikaten wurde dann eine SSCP-Analyse bei zwei unterschiedlichen Bedingungen (Raumtemperatur und + 4 °C) durchgeführt.

Zeigte sich bei einem Patienten eine Abweichung des Laufmusters, wurde die PCR und SSCP-Analyse wiederholt und bei Bestätigung der Abweichung anschließend eine Sequenzierung zur Identifikation der betreffenden Mutation vorgenommen.

Des weitern erfolgte, sofern möglich, eine Verifikation des Befundes mittels Restriktionsfragment-Längen-Polymorphismus-Analyse.

Um sicherzugehen, dass es sich bei den identifizierten Mutation nicht um einen Polymorphismus handelt, wurden jeweils 200 gesunde Kontrollen auf das Vorhandensein der betreffenden genetischen Variante untersucht; keine der von uns gefundenen Mutationen zeigte sich in dem Kontrollkollektiv.

Insgesamt konnten fünf Mutationen im *MYBPC3* Gen identifiziert werden.

Bei einer Variante handelt es sich um einen Basenaustausch, der zu einer stummen Mutation führt. Drei der Varianten sind ebenfalls Basenaustausche, die jeweils Ursache einer Aminosäuresubstitution sind.

Desweiteren wurde eine Mutation in Intron 6 (IVS6-46 InsC) gefunden, deren Relevanz für die Entstehung einer DCM höchst wahrscheinlich unbedeutend ist, da sie 46 Positionen vom Exon entfernt liegt.

Die Mutation N948T wurde von uns publiziert, die Veröffentlichung der anderen steht noch aus.

Mutation	Nukleotidposition	Lokalisation im Protein
A536A	9229 T>A / Exon 17	C3-Domäne
A774T	14031 G>A / Exon 24	C6-Domäne
D880E	15705 C>A / Exon 26	C7-Domäne
N948T	16575 A>C / Exon 27	C7-Domäne

Tab. 3.1. 1: Die im Rahmen dieser Arbeit identifizierten Mutationen im MYBPC3

3.1.1 A536A (Exon 17)

Bei der SSCP-Analyse des Patienten 400 zeigte sich eine Laufmusterabweichung sowohl bei Raumtemperatur als auch bei 4 °C. Die im Anschluss durchgeführte Sequenzierung ergab einen Basenaustausch von Thymidin zu Adenin an Position 9229. Das entstehende Basentriplett kodiert die gleiche Aminosäure. Es handelt sich somit um eine stumme Mutation.

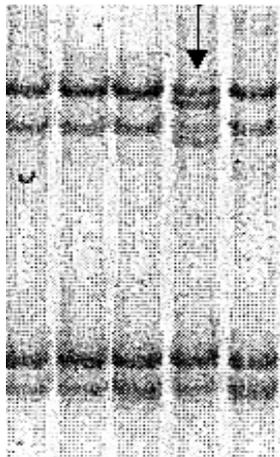


Abb.3.1.1: SSCP-Analyse des Exons 17; Pfeil: Patient 400

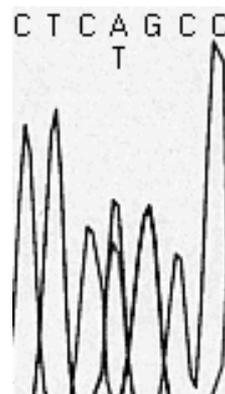


Abb. 3.1.2: Rückwärtssequenzierung des Exons 17 von Patient 400

3.1.2 A774T (Exon 24)

Genotyp

Die SSCP-Analyse von Exon 24 zeigt bei Patient 1404 eine Laufmusterabweichung bei 4°C. Die Sequenzierung des entsprechenden Exons ergab an Position 14032 einen Basenaustausch von Guanin zu Adenin. Dieses führt zu einem neuen Basentriplett, welches einen Aminosäureaustausch von Alanin zu Threonin bedingt.

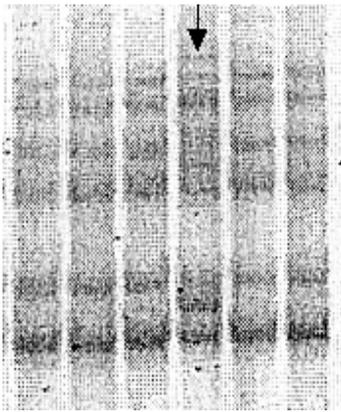


Abb. 3.1.3: SSCP-Analyse des Exons 24; Pfeil: Patient 1404

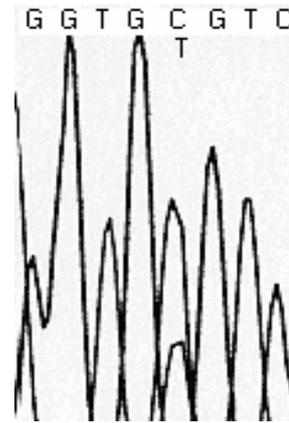


Abb. 3.1.4: Rückwärtssequenzierung des Exons 24 von Patient 1404

Zur Bestätigung dieser Variante wurde ein Restriktionsverdau durchgeführt. Die Transition von Guanin zu Alanin zerstört die Erkennungssequenz der Restriktionsendonuklease *HgaI* und verhindert die Spaltung des mutierten Allels. Nach Amplifikation des Exon 24 und anschließendem enzymatischen Verdau entstehen somit beim Wildtyp Fragmentgrößen von 53 und 237 Basenpaaren. Beim Vorhandensein der Mutation zeigt sich zusätzlich ein Fragment mit der Größe von 290 Basenpaaren, da ein Allel nicht geschnitten wird.

Dieser Verdau wurde verwendet, um die Familienmitglieder auf das Vorhandensein der Mutation zu testen. Es konnten insgesamt drei der Mitglieder der Familie untersucht werden. Der Vater und die Schwester des Patienten konnten als Mutationsträger identifiziert werden.

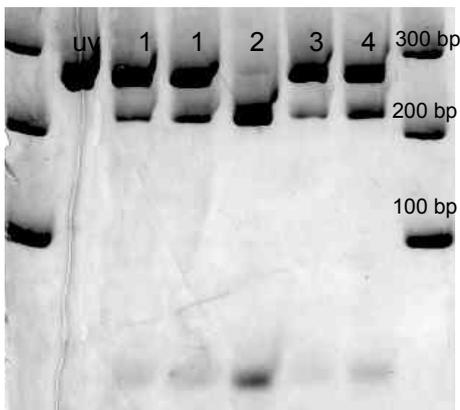


Abb. 3.1.5: Verdau mittels *HgaI*; uv: unverdaut, 1: Patient 1404, 2: Mutter, 3: Vater, 4: Schwester

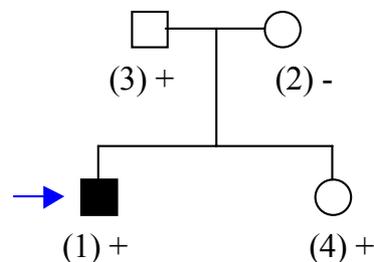


Abb. 3.1.6: Stammbaum der Familie des Patienten 1404; Kreis: weiblich, Quadrat: männlich, ausgefülltes Symbol: DCM-Phänotyp, +: Mutationsträger, -: Wildtyp, Pfeil: Patient 1404

Die Position 774 des Aminosäurerestes Alanin ist teilweise konserviert, denn man findet sie sowohl bei Mensch, als auch bei der Maus. Die Homologie des Gesamtproteins beträgt zwischen Mensch und Maus 84% und zwischen Mensch und Huhn 65%. Die hier beschriebene Mutation liegt beim Vergleich des Proteins der Maus mit dem des Menschen in einer hoch konservierten Domäne.

Mensch	750	TVT	VKN	PVGED	QVN	LTV	KVID	V	A	PAAPKI	780
Maus	746	TVT	VKN	PVGED	QVN	LTV	KVID	V	A	PAAPKI	776
Huhn	748	V	VKN	PVGED			TVK	VID	V	P APKI	778

Tab. 3.1.2: Homologievergleich zwischen der Proteinsequenz des MybPC3 von Mensch (Y10129), Maus (NM008653) und Huhn (D43697). Der Aminosäurerest A774 ist in den Spezies Mensch und Maus konserviert.

Phänotyp

Die Erkrankung wurde bei dem Patienten 1404 im Alter von 15 Jahren gestellt. Zum Zeitpunkt der Diagnosestellung zeigte der Patient das Bild einer akut dekompensierten Herzinsuffizienz mit einem NYHA Stadium IV. Derzeit ist der Status stabil. Der Vater des Patienten hat einen Hypertonus, die Blutdruckwerte sind jedoch unter medikamentöser Therapie in Normbereich. Die Echokardiographie zeigte Veränderungen in Sinne eines Cor hypertonicum. Die 15 jährige Schwester des Patienten weist ebenfalls keinerlei Symptome einer DCM auf. Die Echokardiographie ergab einen Normalbefund.

3.1.3 D880E (Exon 26)

Genotyp

Im Exon 26 konnten wir bei Patient 1205 im SSCP-Gel bei Raumtemperatur eine Laufmusterabweichung identifizieren. Die Sequenzierung ergab einen Basenaustausch an Position 15705 von Cytosin zu Adenin. Resultat dieses Austausches ist eine Substitution von Asparaginsäure zu Glutaminsäure.

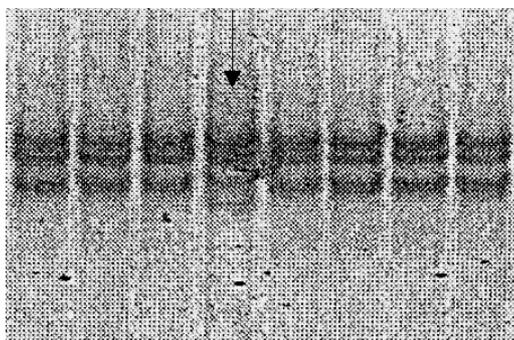


Abb. 3.1.7: SSCP-Analyse des Exons 26; Pfeil: Patient 1205

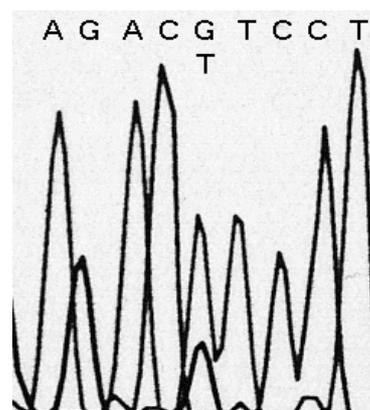


Abb. 3.1.8: Rückwärtssequenzierung des Exons 26 von Patient 1205

Die Bestätigung der Mutation wurde ebenfalls mittels Restriktionsverdau durchgeführt. Der Aminosäureaustausch von Cytosin zu Adenin hat zur Folge, dass das Enzym *AatII* aufgrund der Veränderung seiner Erkennungssequenz an der betreffenden Stelle nicht mehr schneiden kann. Da das mutierte Allel somit nicht geschnitten wird, entspricht die Fragmentlänge der des PCR-Produktes (248 Basenpaare). Liegt die Sequenz des Wildtyps vor, wird das PCR-Produkt geschnitten und es entstehen zwei Fragmente mit den Längen von 110 und 138 Basenpaaren.

Nach Etablierung des Verdaues wurde dieser verwendet, um die Familienangehörigen des betreffenden Patienten auf das Vorliegen der Mutation hin zu untersuchen.

Von den Mitgliedern der Familie konnte der dreijährige Sohn des Patienten als Mutationsträger identifiziert werden.

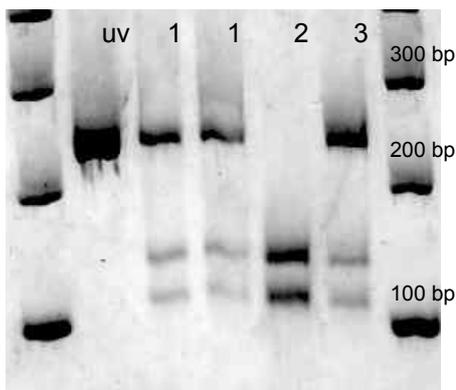


Abb. 3.1.9: Verdau mittels *AatII*;
uv: unverdaut, 1: Patient 1205,
2: Mutter, 3: Sohn

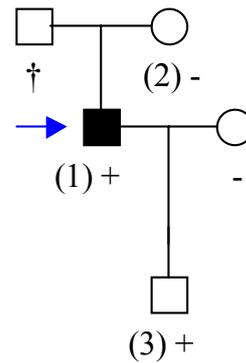


Abb. 3.1.10: Stammbaum der Familie des Patienten 1205; Kreis: weiblich, Quadrat: männlich, ausgefülltes Symbol: DCM-Phänotyp, +: Mutationsträger, -: Wildtyp, Pfeil: Patient 1205

Die Aminosäure Asparaginsäure ist an der Position 880 des MybPC3 evolutionär konserviert. Man findet sie sowohl bei Mensch, als auch bei Maus und Huhn. Die Mutation liegt im Vergleich zwischen Mensch und Maus in einer hoch konservierten Domäne und im Vergleich mit dem Huhn in einer relativ hoch konservierten Domäne des Proteins.

Mensch	860	ASQPFMPIGPPSEPTHLAVE	D	VSDTTVSLKW	890
Maus	856	ASQPFMPIGPP EPTHLAVE	D	VSDTTVSLKW	886
Huhn	858	ASQPFMPI PPSEPTH VE	D	VSDTTV LKW	888

Tab. 3.1.3: Homologievergleich zwischen der Proteinsequenz des MybPC3 von Mensch (Y10129), Maus (NM008653) und Huhn (D43697). Der Aminosäurerest D880 ist in allen drei Spezies konserviert.

Phänotyp

Die Diagnose einer DCM wurde bei Patient 1205 im Alter von 31 Jahren gestellt. Aufgrund von Herzrhythmusstörungen wurde ein AICD implantiert. Zur Zeit ist der Patient unter medikamentöser Therapie stabil. Der 3 jährige Sohn des Patienten weist zur Zeit keinerlei Symptome einer Herzinsuffizienz auf. Die Echokardiographie des Sohnes ergab einen altersentsprechenden Normalbefund.

3.1.4 N948T (Exon 27)

Genotyp

Bei Patient 942 wurde in der SSCP-Analyse bei Raumtemperatur ein von den anderen Patienten abweichendes Bandenmuster identifiziert. Als Ursache dieser beim Patienten 942 vorhandenen zusätzlichen Bande konnte in der Sequenzierung eine Basensubstitution an Position 16575 gefunden werden. Diese Substitution führte in der Proteinsequenz zu einem Austausch der Aminosäure Asparagin zu Threonin an Position 948.

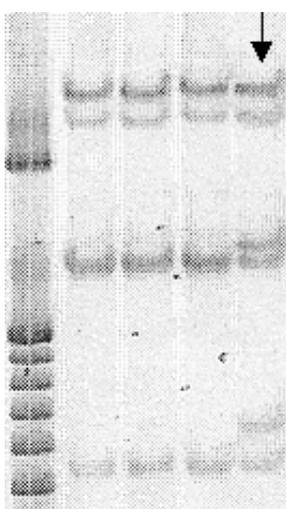


Abb. 3.1.11: SSCP-Analyse des Exons 27; Pfeil: Patient 942

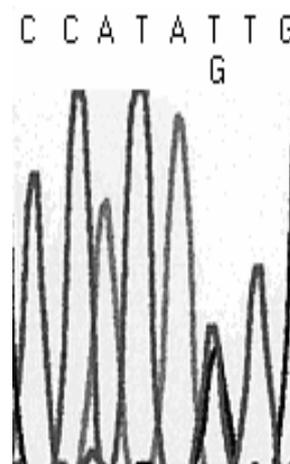


Abb. 3.1.12: Rückwärtssequenzierung des Exons 27 von Patient 942

Zur Bestätigung dieser Mutation war es aufgrund des Fehlens einer geeigneten Restriktionsendonuklease nicht möglich einen Restriktionsverdau durchzuführen. Zur Bestätigung dieser Mutation wurde eine unabhängige Probe erneut vorwärts- und rückwärtssequenziert. Die Angehörigen des Patienten lehnten eine genetische Untersuchung ab.

Die Aminosäure Asparagin an Position 948 des MybPC3 ist evolutionär konserviert. Man findet sie sowohl beim Menschen, als auch bei der Maus und dem Huhn. Der Vergleich des Proteins zwischen Mensch und Maus zeigt, dass sich die Mutation in einer relativ hoch konservierten Domäne des Proteins befindet. Zwischen Mensch und Huhn ist die Konservierung deutlich geringer.

Mensch	919	ALQGLTEHTSILVKDLPTGARLLFRVRAH	N	M	949
Maus	915	ALQGLTE S LVKDLPTGARLLFRVRAH	N		945
Huhn	917	AL GLTE TS L KDL TG L FRV A	N		947

Tab. 3.1.4: Homologievergleich zwischen der Proteinsequenz des MybPC3 von Mensch (Y10129), Maus (NM008653) und Huhn (D43697). Der Aminosäurerest N948 ist in allen drei Spezies konserviert.

Phänotyp

Der Patient war zum Zeitpunkt der Diagnosestellung 36 Jahre alt. Unter medikamentöser Therapie entsprach er, aufgrund der klinischen Symptomatik einem NYHA Stadium III. Der Patient erhielt ebenfalls einen AICD.

3.2 Polymorphismen im *MybPC3*-Gen

Neben den oben beschriebenen Mutationen konnten acht Polymorphismen im MybPC3 Gen identifiziert und ihre Allelfrequenz in der Patienten- und Kontrollkohorte bestimmt werden. Die Ergebnisse der Kontrollkohorte wurden mir von den anderen Doktoranden unserer Arbeitsgruppe überlassen. Die Auswertung erfolgte mittels der im Folgenden beschriebenen Methoden.

Die zu erwartenden Genotypen wurden mit Hilfe des Hardy-Weinberg-Gesetzes berechnet. Um zu ermitteln, ob es sich bei Abweichungen zwischen diesen berechneten Genotypen und den tatsächlich beobachteten um signifikante Veränderungen handelt, wurde ein χ^2 -Test durchgeführt. Durch diesen Test erhält man den p-Wert; ist dieser Wert kleiner als 0.05 besteht eine signifikante Veränderung.

Die Allelfrequenz der an DCM erkrankten Patienten wurde mit der von gesunden Kontrollen verglichen, um festzustellen ob dem *MybPC3* Gen eine Modifierfunktion im Rahmen der Entstehung einer DCM zukommt.

Die Prüfung auf eine Signifikanz der Unterschiede zwischen den Allelfrequenzen erfolgte ebenfalls mittels des χ^2 -Testes.

Die Polymorphismen wurden untereinander auf eventuelle Kopplungen der Genotypen hin untersucht.

Variante	Nukleotidposition	Allelfrequenz (%) (n=46)
S236G	4229 A>G	83/17
T262T	4825 C>T	86/14
R326Q	6396 G>A	99/1
IVS 12 -24 C/T	8175 C>T	68/32
IVS 21 +38 A/T	12209 A>T	99/1
IVS 23 +8 C/G	13314 C>G	96/4
IVS 33 -91 G/A	19706G>A	80/20
IVS 33 -66 C/T	19731 C>T	80/20

Tab. 3.2. 1: Im Rahmen dieser Arbeit identifizierte Polymorphismen im MYBPC3-Gen.

3.2.1 Exon 6, 4229 A>G; S236G

Dieser bekannte Polymorphismus konnte durch eine Laufmusterabweichung in der SSCP-Analyse bei Raumtemperatur und 4 °C identifiziert werden.

Zur Überprüfung des Austausches wurden exemplarisch 6 der Patienten, jeweils zwei mit dem gleichen Laufmuster, sequenziert.

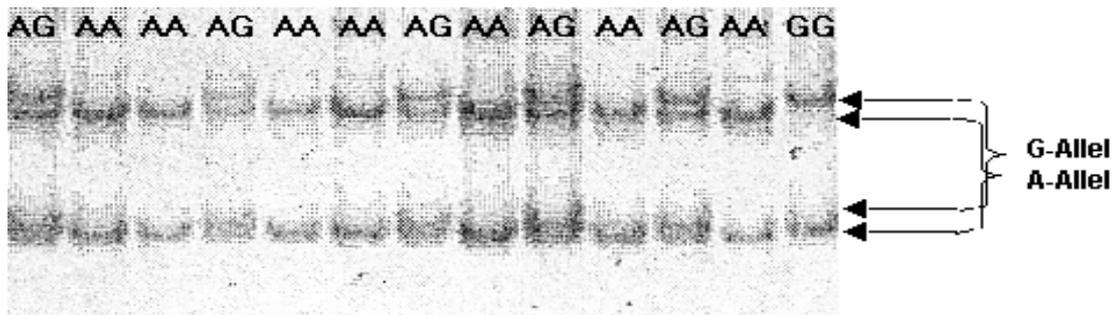


Abb. 3.2.1: SSCP-Analyse des Exon 6, bei 4°C. Die Genotypen die dem gezeigten Bandenmuster entsprechen sind jeweils angegeben.

	DCM (n = 46)	Genotypen			Allelfrequenz	
		AA	AG	GG	A- Allel	G- Allel
Beobachtet		33	10	3	76 (0.83)	16 (0.17)
Erwartet		31.69	12.98	1.33		
P- Wert	0.2423					
	Kontrollen (n = 84)					
Beobachtet		66	17	1	149 (0.89)	19 (0.11)
Erwartet		66.54	16.45	1.07		
P- Wert	0.9864				P-Wert	0.7903

Tab. 3.2.2: Darstellung der beobachteten und erwarteten Genotypverteilung und der Allelfrequenzen des Polymorphismus im Exon 6, 4229 A>G; S236G

Die Genotypenverteilung befindet sich im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht. Es konnte kein signifikanter Unterschied der Allelfrequenzen zwischen dem Patienten- und Kontrollkollektiv identifiziert werden.

3.2.2 Exon 7, 4825 C>T; T262T

Erkannt wurde dieser Polymorphismus durch eine Laufmusterabweichung der SSCP-Analyse, sowohl des 4°C-Gels als auch des Gels, welches bei Raumtemperatur lief.

Mittels der Restriktionsendonuklease *HpaII* wurde die RFLP-Analyse durchgeführt. Der Wildtyp wird geschnitten und zeigt zwei Banden mit einer Länge von 90 und 119 Basenpaaren. Bei Personen mit der Variante wird das PCR-Produkt nicht geschnitten wodurch eine Bande mit einer Länge von 209 Basenpaaren resultiert. Liegt die Variante in heterozygoter Form vor, zeigen sich 3 Banden, da ein Allel geschnitten wird und das andere nicht.

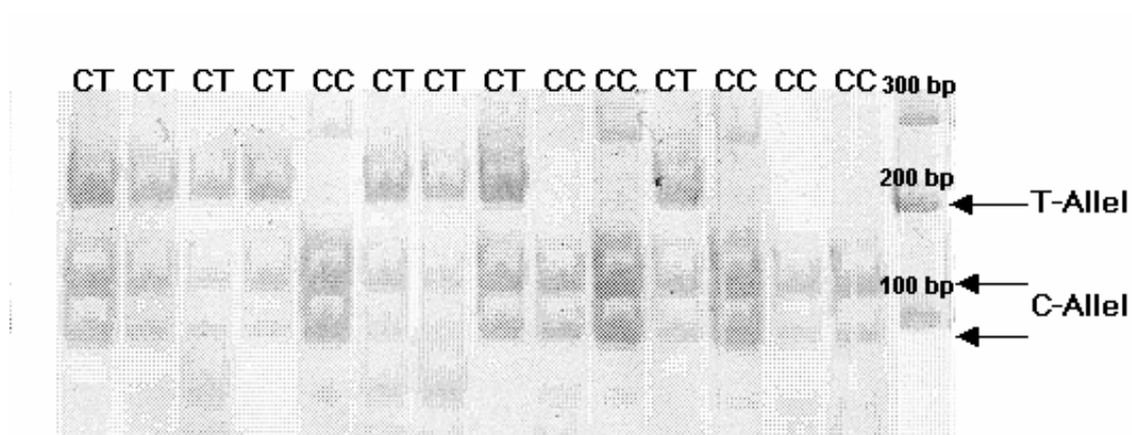


Abb. 3.2.2: RFLP-Analyse mittels *HpaII*, die dem Bandenmuster entsprechenden Genotypen sind jeweils vermerkt.

	DCM (n = 46)	Genotypen			Allelfrequenz	
		CC	CT	TT	C- Allel	T- Allel
Beobachtet		33	13	0	79 (0.86)	13 (0.14)
Erwartet		34.02	11.08	0.9		
P- Wert	0.5317					
	Kontrollen (n = 140)					
Beobachtet		112	25	3	249 (0.89)	31 (0.11)
Erwartet		110.89	27.41	1.69		
P- Wert	0.5384				P-Wert	0.8921

Tab. 3.2.3: Darstellung der beobachteten und erwarteten Genotypverteilung und der Allelfrequenzen des Polymorphismus im Exon 7, 4825 C>T; T262T.

Die Verteilung der Genotypen befindet sich im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht. Ein signifikanter Unterschied in der Allelverteilung zwischen Patienten und Kontrollen besteht nicht.

Die Durchführung der Korrelationsanalyse ergab eine 53,6%_{ige} Übereinstimmung der Genotypen zwischen diesem und dem in Exon 6 vorhandenen Polymorphismus.

3.2.3 Exon 12, 6396 G>A ; R326Q

Bei diesem seltenen Polymorphismus handelt es sich um einen G>A-Austausch an Position 6396. Ein Patient zeigte einen heterozygoten Genotyp, alle anderen Genotypen waren vom Wildtyp. Die Auswertung erfolgte durch eine SSCP-Analyse. Zur Bestätigung der Variante wurde eine Sequenzierung durchgeführt.

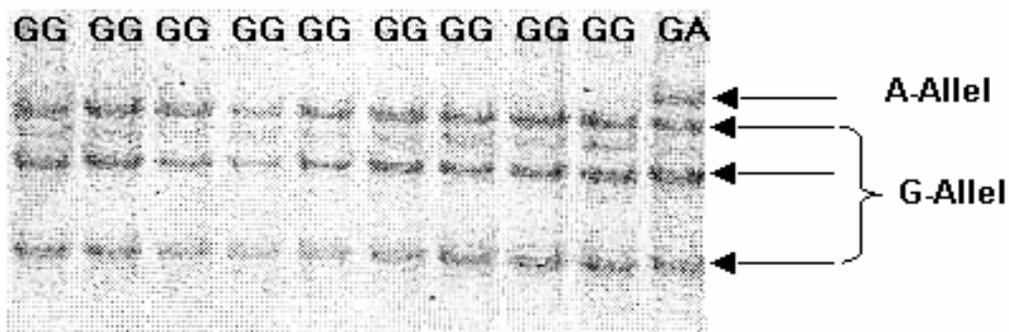


Abb. 3.2.3: SSCP-Analyse des Exon 12. Der heterozygote Genotyp zeigt eine zusätzliche Bande oberhalb der ersten, beim Wildtyp vorhandenen.

		Genotypen			Allelfrequenz	
	DCM (n = 46)	GG	GA	AA	G- Allel	A- Allel
Beobachtet		45	1	0	91 (0.99)	1 (0.01)
Erwartet		45.08	0.91	0.005		
P- Wert	0.9930					
		Kontrollen (n = 44)				
Beobachtet		42	2	0	86 (0.98)	2 (0.02)
Erwartet		42.26	1.72	0.02		
P- Wert	0.967				P-Wert	0.891

Tab. 3.2.4: Darstellung der beobachteten und erwarteten Genotypverteilung und der Allelfrequenzen des Polymorphismus im Exon 12, 6396 G>A ; R326Q

Die Verteilung der Genotypen befindet sich im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht. Auch bei diesem Polymorphismus besteht kein signifikanter Unterschied in der Verteilung der Allele zwischen den Patienten mit DCM und den Kontrollen. Die Untersuchung der Korrelation ergab eine 100%_{ige} Übereinstimmung mit dem in Exon 21 (IVS 21+38, A>T) und eine 48.3%_{ige} Übereinstimmung mit dem in Exon 23 (IVS 23+8, C>G) vorhandenem Polymorphismus.

3.2.4 IVS 12-24, C>T

Bei dieser Variante handelt es sich um einen C>T-Austausch im Intron 12, 24 Basenpaare vor Exon 13.

Mit Hilfe der Restriktionsendonuklease *EaeI* wurde eine RFLP-Analyse durchgeführt. Beim Wildtyp zeigen sich bei der gelelektrophoretischen Auftrennung der Verdauungsprodukte drei Banden von 54, 89 und 133 Bp. Bei Patienten mit heterozygotem Genotyp ist eine zusätzliche Bande von 187 Bp vorhanden. Patienten die für die Variante homozygot sind, haben Banden mit einer Länge von 89 und 187 Bp.

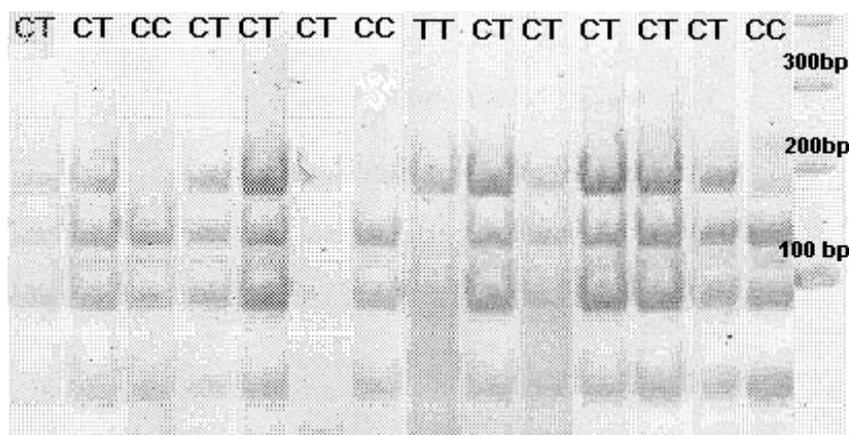


Abb. 3.2.4: RFLP-Analyse mittels EaeI. Die jeweiligen Genotypen sind über dem entsprechenden Bandenmuster angegeben.

	DCM (n = 46)	Genotypen			Allelfrequenz	
		CC	CT	TT	C- Allel	T- Allel
Beobachtet		21	21	4	63 (0.68)	29 (0.32)
Erwartet		21.27	20.02	4.71		
P- Wert	0.9238					
	Kontrollen (n = 91)					
Beobachtet		37	44	10	118 (0.65)	64 (0.35)
Erwartet		38.45	41.41	11.15		
P- Wert	0.8457				P-Wert	0.9173

Tab. 3.2.5: Darstellung der beobachteten und erwarteten Genotypverteilung und der Allelfrequenzen des Polymorphismus IVS 12-24, C>T.

Die Verteilung der Genotypen ist gemäß dem Hardy-Weinberg-Gesetz.

Es besteht kein signifikanter Unterschied in der Allelverteilung zwischen Patienten und Kontrollen.

3.2.5 IVS 21+38, A>T

Bei diesem Polymorphismus handelt es sich um eine seltene Variante. Nur ein Patient zeigte einen heterozygoten Genotyp für diese Variante. Die Auswertung dieses Polymorphismus erfolgte mittels bei Raumtemperatur durchgeführter SSCP-Analyse. Die Sequenzierung diente der Kontrolle und bestätigte den Genotyp.

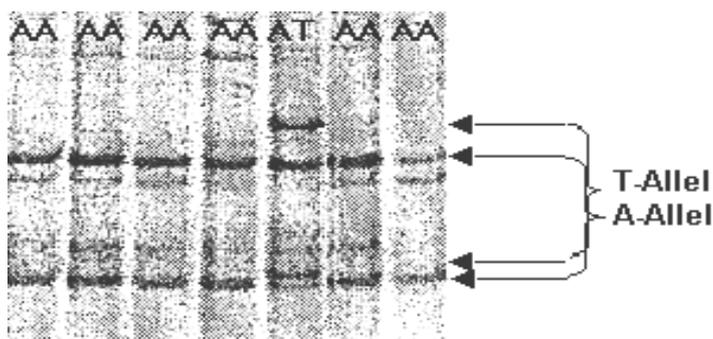


Abb. 3.2.5: SSCP-Analyse des Exon 21. Die Genotypen sind jeweils über dem entsprechenden Bandenmuster vermerkt.

		Genotypen			Allelfrequenz	
	DCM (n = 46)	AA	AT	TT	A- Allel	T- Allel
Beobachtet		45	1	0	91 (0.99)	1 (0.01)
Erwartet		45.08	0.91	0.005		
P- Wert	0.9930					
		Kontrollen (n = 44)				
Beobachtet		42	2	0	86 (0.98)	2 (0.02)
Erwartet		42.26	1.72	0.02		
P- Wert	0.967				P-Wert	0.891

Tab. 3.2.6: Darstellung der beobachteten und erwarteten Genotypverteilung und der Allelfrequenzen des Polymorphismus IVS 21+38, A>T.

Sowohl die Genotypen der Patienten, als auch die der Kontrollen befinden sich im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht.

Es konnte keine signifikante Abweichung in der Allelverteilung zwischen Patienten und Kontrollen identifiziert werden.

Die Analyse der Korrelation wurde durchgeführt und zeigte das Vorhandensein einer 100%_{ige} Übereinstimmung mit Genotypen in Exon 12 und eine 48,3%_{ige} Übereinstimmung mit denen in Exon 23 (IVS 23+8, C>G).

3.2.6 IVS 23+8, C>G

Diese Variante besteht aus einem C>G-Austausch in Intron 23. Die Auswertung erfolgte durch eine bei Raumtemperatur durchgeführte SSCP-Analyse. Zur Bestätigung der Varianten wurde eine Sequenzierung durchgeführt, diese ergab eine C>G-Transition in Intron 23, 8 Basenpaare hinter dem Exon 23.

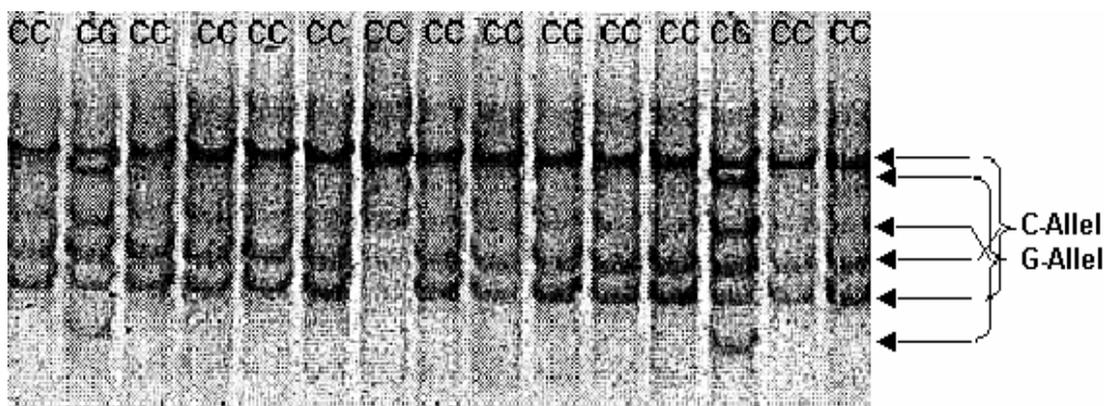


Abb. 3.2.6: SSCP-Analyse des Exon 23. Die entsprechenden Genotypen sind angegeben.

		Genotypen			Allelfrequenz	
	DCM (n = 46)	CC	CG	GG	C- Allel	G- Allel
Beobachtet		42	4	0	88 (0.96)	4 (0.04)
Erwartet		42.39	3.53	0.07		
P- Wert	0.9342					
	Kontrollen (n =37)					
Beobachtet		32	5	0	69 (0.93)	5 (0.07)
Erwartet		32	4.8	0.18		
P- Wert	0.9101				P-Wert	0.9931

Tab. 3.2.7: Darstellung der beobachteten und erwarteten Genotypverteilung und der Allelfrequenzen des Polymorphismus IVS 23+8, C>G.

Es besteht ein Hardy-Weinberg-Gleichgewicht bei der Genotypverteilung. Zwischen den Kontrollen und den Patienten mit DCM bestehen keine signifikanten Abweichungen in der Allelfrequenz.

3.2.7 IVS 33-66, C>T

Beim siebten Polymorphismus handelt es sich um eine C >T Transition im Intron 33, 66 Basenpaare vom Exon 34 entfernt.

Mit Hilfe der Restriktionsendonuklease *NlaIII* wurde eine RFLP-Analyse durchgeführt.

Beim Wildtyp zeigten sich bei der gelelektrophoretischen Auftrennung der Produkte des Restriktionsverdaus zwei Banden mit 83 und 111 Bp Länge, da das

Enzym einmal schneidet. Liegt die Variante in heterozygoter Form vor, wird das T-Allel ein weiteres mal geschnitten, dadurch kommt es zu zwei zusätzlichen Banden mit den Längen von 48 und 63 Bp.

Demgegenüber zeigt die homozygote Form der Variante drei Banden mit einer Länge von 48, 63 und 83 Bp.

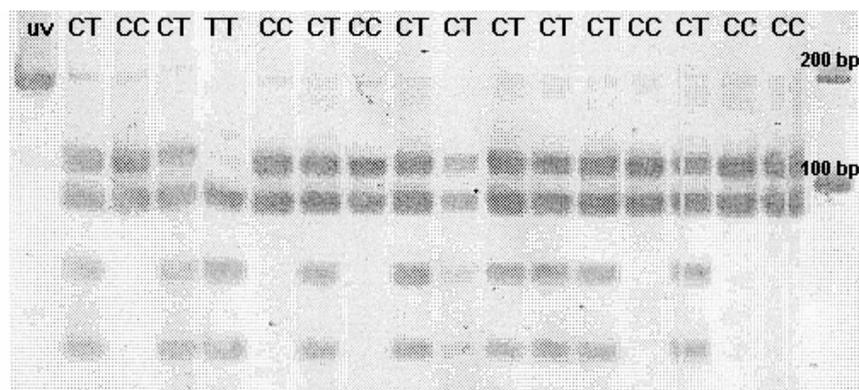


Abb. 3.2.7: RFLP-Analyse mit NlaIII. „uv“ entspricht der unverdauten Probe, die Genotypen der anderen Bandenmuster sind jeweils angegeben.

		Genotypen			Allelfrequenz	
	DCM (n = 46)	CC	CT	TT	C- Allel	T- Allel
Beobachtet		29	16	1	74 (0.8)	18 (0.2)
Erwartet		29.44	14.72	1.84		
P- Wert	0.7783					
	Kontrollen (n =34)					
Beobachtet		23	10	1	56 (0.82)	12 (0.18)
Erwartet		22.86	10.04	1.10		
P- Wert	0.995				P-Wert	0.9986

Tab. 3.2.8: Darstellung der beobachteten und erwarteten Genotypverteilung und der Allelfrequenzen des Polymorphismus IVS 33-66, C>T.

Die Genotypen beider Personengruppen befinden sich im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht.

Es zeigte sich keine signifikante Abweichung in der Allelverteilung zwischen Patienten und Kontrollen.

3.2.8 IVS 33-91, G>A

Dieser im Intron 33 befindliche Polymorphismus wurde mit Hilfe von Raumtemperatur-SSCP-Analysen und Sequenzierungen ausgewertet.

Das folgende SSCP-Gel zeigt sowohl diese als auch die unter 3.2.7 beschriebene und hier in der Mitte des Gels befindliche Variante, die sich ebenfalls in Intron 33 (IVS33-66, C>T) befindet.

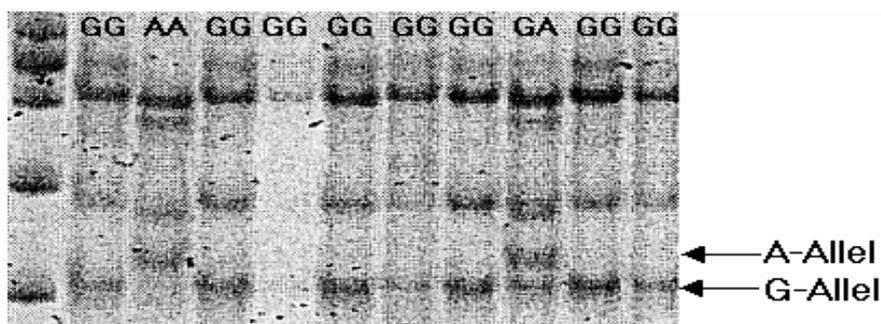


Abb. 3.2.8: SSCP-Analyse bei Raumtemperatur. Die jeweiligen Genotypen sind vermerkt.

		Genotypen			Allelfrequenz	
	DCM (n = 46)	GG	GA	AA	G- Allel	A- Allel
Beobachtet		29	16	1	74 (0.8)	18 (0.2)
Erwartet		29.44	14.72	1.84		
P- Wert	0.7783					
	Kontrollen (n = 34)					
Beobachtet		23	10	1	56 (0.82)	12 (0.18)
Erwartet		22.86	10.04	1.10		
P- Wert	0.995				P-Wert	0.9986

Tab. 3.2.9: Darstellung der beobachteten und erwarteten Genotypverteilung und der Allelfrequenzen des Polymorphismus IVS 33-91, G>A.

Die Genotypenverteilung befindet sich im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht.

Der Vergleich der Allelfrequenz der Patientenpopulation mit der, der Kontrollpopulation zeigte keine signifikanten Unterschiede.

Es besteht eine 100%ige Korrelation zwischen den beiden, im Intron 33 befindlichen, Polymorphismen.

3.3 Mutationssuche im Alpha-Tropomyosin-Gen

Es erfolgte eine systematische Mutationssuche im Alpha-Tropomyosin-Gen, bei 46 unverwandten Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie. Diese Suche erfolgte wie unter 3.1 bereits beschrieben, bei 4°C und Raumtemperatur in der SSCP-Analyse. Diese zeigte keine Auffälligkeiten, so dass davon auszugehen ist, dass mit 97%iger Sicherheit bei den untersuchten Patienten keine Varianten im Alpha-Tropomyosin-Gen existierten.