

Aus der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Kardiologie
der Medizinischen Fakultät der Charité
Universitätsmedizin Berlin Campus Virchow

DISSERTATION

Genetische Varianten im Desmoglein-2 Gen bei Patienten mit
familiärer dilatativer Kardiomyopathie

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Charité
Universitätsmedizin Berlin

von Matthias Jakob Posch

aus Freiburg im Breisgau

Gutachter:

1. Prof. Dr. med. W. Haverkamp

2. Priv.-Doz. Dr. rer. nat. H. Milting

3. Priv.-Doz. Dr. med. Th. Scheffold

Datum der Promotion: 19.11.2010

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
1.1	KARDIOMYOPATHIEN	1
1.2	DILATATIVE KARDIOMYOPATHIE	3
1.3	FAMILIÄRE DILATATIVE KARDIOMYOPATHIE	4
1.4	GENETIK DER DCM	5
1.5	ZELL-ZELL KONTAKTE IM MYOKARDGEWEBE- DIE INTERCALATED DISC	9
1.5.1	Gap junction	9
1.5.2	Adhaerens Junction	9
1.5.3	Desmosomen (maculae adhaerentes)	10
2	ZIELSETZUNG DER ARBEIT	13
3	MATERIAL	15
3.1	GERÄTE	15
3.2	LÖSUNGEN	16
4	METHODEN	18
4.1	KLINISCHE UNTERSUCHUNG DER PATIENTEN	18
4.2	EXTRAKTION DER DNS	18
4.3	DIE POLYMERASEKETTENREAKTION – POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR)	19
4.3.1	PCR- Ansatz	19
4.3.2	PCR-Programm	21
4.4	DNS-SEQUENZIERUNG	22
4.4.1	Enzymatische Aufreinigung der Proben	22
4.4.2	Cycle Sequencing	22
4.4.3	Aufreinigung mit der Sephadexfilterplatte	23
4.4.4	Automatische DNS-Sequenzierung mit dem ABI 3100 AVANT	23
4.5	RFLP-RESTRIKTIONSFRAGMENTLÄNGENPOLYMORPHISMUS	24
4.6	SSCP- SINGLE STRANDED CONFORMATION POLYMORPHISM	24
4.6.1	Gießen der SSCP Gele	25
4.6.2	SSCP-Elektrophorese und Färbung der Gele	26
4.7	STATISTISCHE ANALYSE	26

5	ERGEBNISSE	27
5.1	KLINISCHE UNTERSUCHUNG DER INDEX-PATIENTEN UND FAMILIENANGEHÖRIGEN	27
5.2	GENETISCHE ANALYSE	28
5.2.1	Intronische Varianten und nicht-kodierende exonische Varianten	29
5.2.2	Kodierende Varianten in DSG2	30
5.3	WEITERFÜHRENDE UNTERSUCHUNG DER VARIANTEN V56M UND V920G	43
5.3.1	V56M – die Familie des Indexpatienten (4370)	44
5.3.2	V920G – die Familien der Indexpatienten (3454) und (4514)	45
5.4	UNTERSUCHUNGEN ZUR KLÄRUNG DER PATHOGENITÄT DER VARIANTE V56M	48
5.4.2	Assoziationsstudie	48
5.4.3	Genotyp-Phänotyp Studie	51
6	DISKUSSION	53
6.1	BEWERTUNG DER METHODIK	53
6.2	ERGEBNISSE DER GENETISCHE ANALYSE	54
6.2.1	Varianten in intronischen Abschnitten bzw. der untranslatierten Region	55
6.2.2	Synonyme Varianten	56
6.2.3	Kodierende Varianten	57
6.3	DIE VARIANTE V920G	57
6.4	DIE VARIANTE V56M	58
6.4.2	V56M - Hypothesen bezüglich molekularbiologischer Mechanismen	62
7	ZUSAMMENFASSUNG	65
8	LITERATURVERZEICHNIS	66
9	ANHANG	73
9.1	ABKÜRZUNGEN	73
9.2	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	75
9.3	TABELLENVERZEICHNIS	76
9.4	DANKSAGUNG	77
9.5	LEBENS LAUF	78
9.6	PUBLIKATIONS LISTE	78
9.7	EIDESSTÄTTLICHE ERKLÄRUNG	79

1 Einleitung

1.1 Kardiomyopathien

Kardiomyopathien sind eine heterogene Gruppe von Herzmuskelerkrankungen, die mit einer mechanischen und/oder elektrischen Dysfunktion einhergehen. Sie führen zu einer Hypertrophie oder Dilatation der Herzventrikel. Eine genetische Ursache ist je nach Art der Kardiomyopathie unterschiedlich häufig, gilt allerdings bei allen Formen als gesichert. Langfristig führt eine Erkrankung in der Regel zu progressiver Herzinsuffizienz oder plötzlichem Herztod.

Um 1900 kam der Begriff der primären Herzmuskelerkrankungen auf, 1957 wurde in der Literatur erstmals der Begriff der Kardiomyopathie verwendet. 1980 definierte die WHO (*World Health Organization*) Kardiomyopathien als Herzmuskelerkrankungen mit unbekannter Ursache¹. 1995 wurde unter der Schirmherrschaft der WHO eine Einteilung der Kardiomyopathien verfasst, welche die Kardiomyopathien gemäß führender klinischer Charakteristika unterscheidet².

Während die dilatative Kardiomyopathie (DCM) sich durch eine überwiegend systolische Pumpstörung auszeichnet, sind hypertrophe und restriktive Kardiomyopathie (HCM und RCM) vorwiegend mit diastolischen Dehnbarkeitsstörungen des verdickten (HCM) oder fibrosierten (RCM) Myokards assoziiert.

Die arrhythmogene rechtsventrikuläre Dysplasie/Kardiomyopathie (ARVC/D) ist eine Erkrankung des rechten Ventrikels, die mit lebensbedrohlichen ventrikulären Tachykardien oder plötzlichem Herztod einhergehen kann. Die linksventrikuläre-non-compaction Kardiomyopathie (LVNC) ist eine seltene angeborene Erkrankung, welche durch Trabekulierung der Ventrikelwand sowohl zu einer systolischen als auch diastolischen Dysfunktion, sowie zu Arrhythmien und Embolien führen kann. Von diesen Formen wurden die sog. spezifischen Kardiomyopathien bekannter Ursache abgegrenzt.

Diese insbesondere klinisch weit verbreitete Klassifikation ist aus wissenschaftlicher Sicht heute nur noch eingeschränkt anwendbar. Gerade die neuen Erkenntnisse über die molekulargenetischen Hintergründe der Pathogenese von Kardiomyopathien

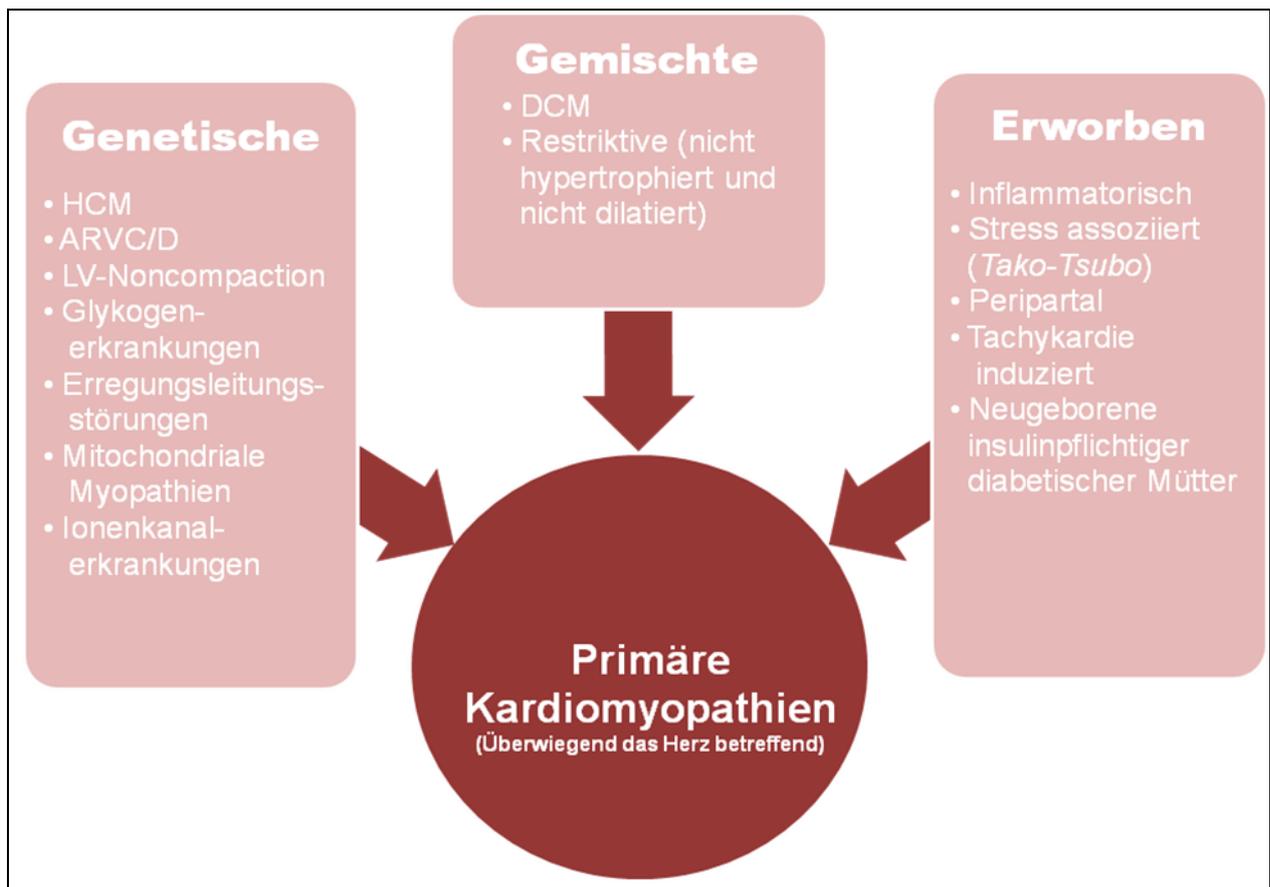
machten eine neue, dem aktuellen Wissenstand entsprechende, Klassifikation, notwendig.

Seit 2006 gilt die neue, von der *American Heart Association* (AHA) verfasste Klassifikation der Kardiomyopathien ³ als wegweisend. Der vorläufige Charakter dieser Klassifikation trägt den schnell wachsenden wissenschaftlichen Erkenntnissen Rechnung. Es wird ätiologisch zwischen primären und sekundären Kardiomyopathien unterschieden.

Das klinische Bild der primären Kardiomyopathien ist in erster Linie durch die Erkrankung des Herzmuskels geprägt. Hier kommen verschiedene Ursachen in Frage. Dies macht eine weitere Unterteilung in gemischte, genetische und erworbene primäre Kardiomyopathien notwendig.

Abbildung 1.1

Unterteilung der primären Kardiomyopathien ³



Als sekundäre Kardiomyopathien werden Systemerkrankungen mit myokardialer Beteiligung bezeichnet. Dabei steht die kardiale Beteiligung nicht im Vordergrund der Erkrankung. Die Ursachen für eine sekundäre Kardiomyopathie sind vielfältig. Sowohl

infektiöse, toxische, hierbei insbesondere alkoholinduzierte und autoimmunologische, systemische Erkrankungen des Gefäßsystems, aber auch genetische syndromale Erkrankungen können zu einer sekundären Kardiomyopathie führen.

1.2 Dilatative Kardiomyopathie

Die DCM ist mit einer Prävalenz von ca. 1:2.500 und einer Inzidenz von 7/100.000/Jahr³ eine relativ häufige Erkrankung. Nach der koronaren Herzerkrankung und der arteriellen Hypertonie ist die DCM dritthäufigste Ursache der Herzinsuffizienz⁴ und der häufigste Grund für die Durchführung einer Herztransplantation³.

Hämodynamisch ist die Erkrankung durch eine gestörte systolische Pumpleistung und eine ventrikuläre Dilatation charakterisiert. Im Verlauf kann es auch zu Störungen der diastolischen Funktion des Herzens kommen. Ventrikuläre und supraventrikuläre Arrhythmien, Störungen im Fortleitungssystem, kardiale Wandbewegungsstörungen sowie eine erhöhte Inzidenz von Thrombembolien und plötzlichem Herztod können das klinische Bild der DCM komplettieren.

Die DCM ist den primären gemischten Kardiomyopathien zugeordnet, da die Erkrankung sowohl erworben als auch genetisch bedingt sein kann. Störungen, welche in direktem Zusammenhang mit einer koronaren Herzerkrankung auftreten, sind definitionsgemäß nicht den Kardiomyopathien zuzurechnen, obwohl eine Koinzidenz in einigen Fällen nicht ausgeschlossen werden kann. Häufig handelt es sich bei der DCM um eine idiopathische Erkrankung, deren Ursache nicht endgültig geklärt werden kann. Zur Diagnose einer idiopathischen DCM (iDCM) müssen folgende Ausschlusskriterien beachtet werden⁵:

- Arterielle Hypertension (> 160/100 mmHg)
- Koronare Herzerkrankung (> 50 prozentige Stenose eines Hauptastes)
- Chronischer Alkoholabusus (>40g/d für Frauen bzw. >80g/d für Männer über einen Zeitraum von mehr als fünf Jahren gemäß den WHO Richtlinien).
- Supraventrikuläre Arrhythmien
- Vorliegen einer schweren systemischen Erkrankung
- Vorliegen einer Erkrankung des Perikards
- Vorliegen eines angeborenen Herzfehlers
- Vorliegen eines cor pulmonale

Es wird angenommen, dass die Pathogenese der iDCM von vielen Faktoren beeinflusst wird. Neben infektiösen, autoimmunen Ursachen scheinen auch genetische Faktoren eine Rolle zu spielen.

1.3 Familiäre dilatative Kardiomyopathie

Der Anteil der familiären Formen an iDCM wird in der Literatur auf >25% beziffert⁶. Andere Untersuchungen schätzen den Anteil erblich bedingter Formen der DCM mit 20-48% sogar noch deutlich höher⁷. Die Diagnose einer familiären DCM (fDCM) erfolgt nach den Richtlinien der *Collaborative Research Group of the European Human and Capital Mobility Project on Familial Dilated Cardiomyopathy*⁵. Von einer fDCM kann ausgegangen werden, wenn in der Familie eines DCM Patienten

- mindestens eine weitere Person mit Zeichen einer DCM identifiziert werden kann
- oder ein Familienangehöriger ersten Grades vor dem 35. Lebensjahres an einem ungeklärten plötzlichen Herztod verstorben ist.

Die entsprechenden Haupt- und Nebenkriterien zur Identifikation betroffener Angehöriger sind den Tabellen 1.1 bzw. 1.2 zu entnehmen; dabei muss entweder die

- Erfüllung mindestens eines Hauptkriteriums
oder
- eine linksventrikuläre Dilatation und die Erfüllung mindestens eines Nebenkriteriums
oder
- die Erfüllung von mindestens drei Nebenkriterien

gegeben sein.

Tabelle 1.1

Haupt- und Nebenkriterien für die Identifikation betroffener Angehöriger

Hauptkriterien
1. LVEF < 45% oder FS < 25%
2. LVEDD > 117%
Nebenkriterien
1. Supraventrikuläre oder ventrikuläre Arrhythmien (Lown IVb) vor dem 50. Lebensjahr
2. LVEED > 112%
3. LVEF < 50% oder FS < 28%
4. AV Block II, III, LSB, Sinusknotendysfunktion
5. Segmentale Wandbewegungsstörungen

LVEF: Linksventrikuläre Ejektionsfraktion; LVEDD: Linksventrikulärer enddiastolischer Durchmesser; FS: Fractional shortening (Fraktionelle Faserverkürzung); AV-Block: atrioventrikulärer Block; LSB: Linksschenkel Block;

Werden die Kriterien von keinem der Angehörigen des Patienten mit DCM erfüllt und können auch keine der obengenannten Ausschlusskriterien festgestellt werden, so spricht man von einer iDCM.

1.4 Genetik der DCM

Im Jahre 1961 wurde die familiäre dilatative Kardiomyopathie erstmals beschrieben⁸⁻¹⁰.

Genetische Untersuchungen sind aufgrund der vielfältigen Ursachen und unterschiedlichen Risikofaktoren, welche die Manifestation der Kardiomyopathie beeinflussen, nicht einfach. Trotzdem konnten in den vergangenen Jahren für die DCM immer mehr Krankheitsgene identifiziert werden. Es sind autosomal-rezessive, x-chromosomale, autosomal-dominante und selten auch mitochondriale Erbgänge¹¹ beschrieben.

X-chromosomale Formen stellen ca. 5-10% der fDCM dar und beruhen meist auf unterschiedlichen Mutationen des Dystrophin Gens^{4,12}. Die bekanntesten Erkrankungen durch Mutationen des Dystrophins sind sicherlich die Muskeldystrophien vom Typ Becker bzw. Duchenne, welche immer auch eine kardiale Beteiligung zeigen.

Daneben sind jedoch auch einige Dystrophin-Mutationen beschrieben, welche zu einer primären DCM ohne eine Beteiligung der Skelettmuskulatur führen^{4,13}.

Autosomal rezessive Erbgänge sind für Troponin I¹⁴ und Desmoplakin¹⁵ nachgewiesen worden. Es konnten bisher jedoch nur wenige betroffene Familien identifiziert werden, sodass es sich hierbei wohl um eher seltene Ursachen von DCM handelt. Für einige Fälle von rezessiv-vererbter DCM konnten bisher noch keine Krankheitsgene identifiziert werden¹⁶. Insgesamt wird der Anteil der rezessiv-vererbten DCM höher geschätzt als es die beschriebenen Krankheitsgene vermuten lassen würden¹².

Die meisten bislang identifizierten Krankheitsgene weisen mit einem Anteil von ca. 70%¹² einen autosomal-dominanten Vererbungsmodus auf. Neue Erkenntnisse konnten insbesondere aus genetischen Analysen von großen Familien mit mehreren Betroffenen gewonnen werden. Solche Familien bieten die Möglichkeit einer genetischen Kopplungsanalyse, wodurch gemeinsam vererbte chromosomale Loci identifiziert werden können.

Da die zuerst identifizierten Krankheitsgene vor allem Proteine des Zytoskeletts betrafen, wurde die fDCM zunächst als eine Krankheit des Zytoskeletts angesehen. Die Rolle des Zytoskeletts als Überträger der Kraft vom Sarkomer auf den Muskelzellverband (*force transition*) bot zudem eine ausreichende pathogenetische Erklärung für die myokardiale Dilatation. Im Verlauf konnten jedoch zunehmend auch Gene aus anderen Bereichen der Zelle mit DCM in Zusammenhang gebracht werden. Es wird daher davon ausgegangen werden, dass die Ätiologie der DCM weitaus heterogener ist¹⁷.

Insgesamt konnten bislang 29 chromosomale Loci und zahlreiche Krankheitsgene für fDCM identifiziert werden (Tabelle 1.2). Es handelt sich um Gene, welche für Proteine des Zytoskeletts, des Sarkomers, der Zell- bzw. Zellkern-Membran kodieren. Gemäß den Funktionen der einzelnen Proteine ist die DCM also pathogenetisch durch Störungen der Kontraktionsbildung im Sarkomer, in der Calcium Regulation, in den nuklearen Strukturen, in den zellulären Dehnungssensoren oder in der Kraftübertragung und der Verankerung zwischen den Zellen verursacht¹⁸.

Tabelle 1.2**Krankheitsgene und Genloci der DCM ^{4,7,19}.**

Chromosomloci	Protein	Gen	Lokalisation	OMIM
Autosomal dominanter Erbgang				
1q11-q23	Lamin A/C	LMNA	Zellkernmembran	150330
1q32	Troponin T	TNNT2	Sarkomer	191045
1q43	α -Actinin 2	ACTN2	Z-Scheibe	102573
2q14-q22	unbekannt			604288
2q31	Titin	TTN	Sarkomer	188840
2q35	Desmin	DES	Zytoskelett	125660
3p21	Troponin C	TNNC1	Sarkomer	191040
3p22	Kardialer Natriumkanal 5A	SCN5A	Zellmembran	600163
4q11	β -Sarkoglykan	SGCB	Zytoskelett	600900
5q33	δ -Sarkoglykan	SGCD	Zytoskelett	601411
6q12-q16	Phospholamban	PLN	Sarkoplasmatisches Retikulum	172405
6q23	unbekannt			602067
6q23-q24	Eye absent homolog 4	EYA4	Zellkern	605362/ 603550
9q13-q22	unbekannt			600884
10q22	Metavinculin	VCL	Zell-Zell Kontakt	193065
10q23	Cypher/ZASP	LDB3	Zytoskelett	605906
11p11	Myosin-binding Protein C	MYBPC3	Sarkomer	600958
11p15	Muscle-LIM Protein	CSRP3	Z-Scheibe	600824
12p12	ATP-sensitiver Kaliumkanal	ABCC9	Zellmembran	601439
14q11	β -Myosin Schwereketten	MYH7	Sarkomer	160760
15q14	Kardiales α -Actin	ACTC	Sarkomer	102540
15q22	α -Tropomyosin	TPM1	Sarkomer	191010
17q12	Telethonin/Titin-cap	TCAP	Z-Scheibe	604488
Autosomal-rezessiver Erbgang				
6p24	Desmoplakin	DSP	Desmosom	125647
19q13	Troponin I	TNNI3	Sarkomer	191044
Unbekannt				212110
X-chromosomal Erbgang				
Xp21.2	Dystrophin	DMD	Zytoskelett	300377
Xq28	Tafazzin	TAZ/G4.5	Mitochondrien	300069

Die Abkürzung der Gene entspricht der internationalen Nomenklatur.

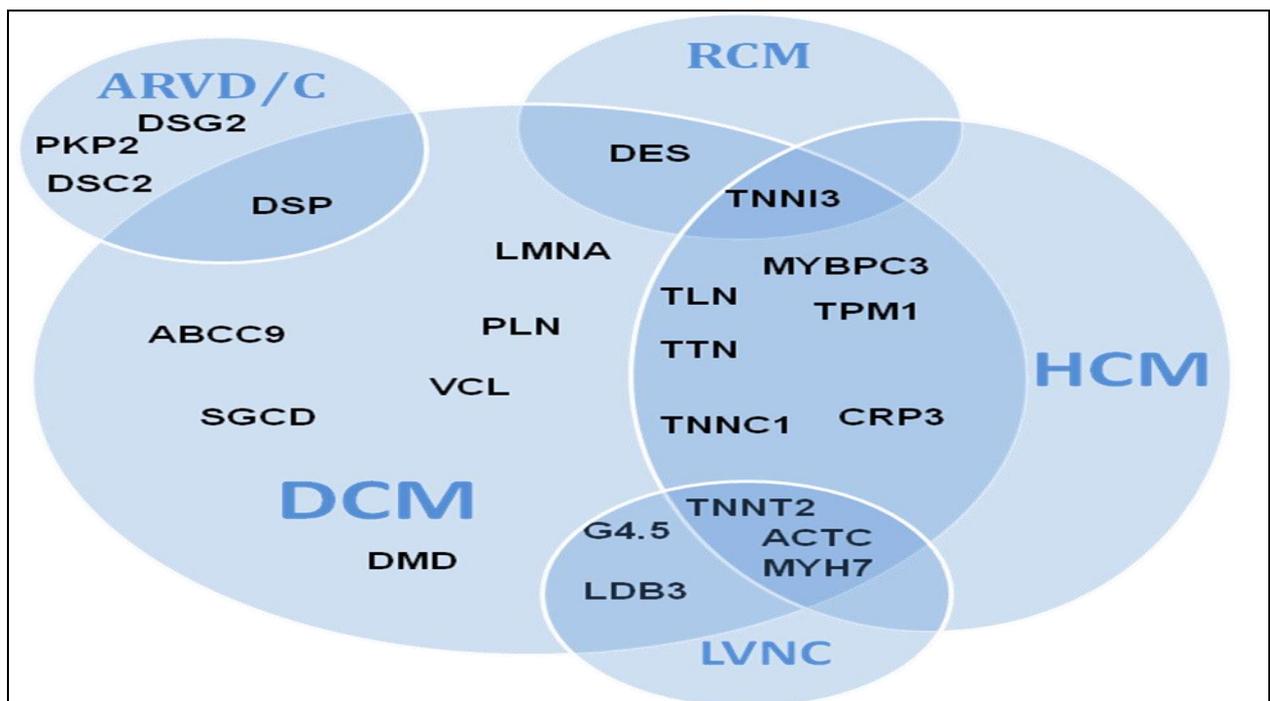
Der klinische Phänotyp der DCM kann je nach betroffenem Gen bzw. Art der genetischen Variante stark variieren und auch ausgeprägte systemische Beteiligung zeigen. Neben den bereits erwähnten Mutationen im Dystrophin sind in diesem Zusammenhang Mutationen im Sarkoglykan δ ²⁰ bzw. β ²¹ und auch einige Mutationen im Lamin A/C zu nennen^{22,23}. Mutationen im Lamin A/C verursachen kardiale Erregungsleitungsstörungen (insbesondere AV-Blockierungen), die der Erstmanifestation der DCM häufig vorausgehen^{24,25}.

Bei unterschiedlichen Formen von Kardiomyopathien kann häufig eine ähnliche genetische Ätiologie beobachtet werden. Das kardiale Troponin I konnte beispielsweise als Krankheitsgen für die hypertrophe, die dilatative und die restriktive Kardiomyopathie identifiziert werden^{14,26,27}. Auch bei anderen Genen wie beispielsweise dem kardialen Muscle-LIM-Protein konnte nach der Identifizierung als Krankheitsgen für DCM²⁸ eine Beteiligung bei der Entstehung von HCM²⁹ nachgewiesen werden.

Neuere Untersuchungen konnten zeigen, dass auch die linksventrikuläre Non-Compaction-Kardiomyopathie durch Mutationen in sarkomerischen Genen verursacht werden kann³⁰. Überschneidungen von Krankheitsgenen scheinen also die Regel zu sein. Dies unterstützt die These, dass Kardiomyopathien zumindest in großen Teilen eine gemeinsame molekulare Grundlage haben³¹.

Abbildung 1.2

Überschneidung von Krankheitsgenen verschiedener Kardiomyopathien



Abkürzung der Gene entsprechend internationaler Nomenklatur.

1.5 Zell-Zell Kontakte im Myokardgewebe- Die *intercalated disc*

Die Kardiomyozyten des Myokardgewebes sind intensiv über Zell-Zell-Kontakte miteinander verbunden, die sowohl die Erregungsförderung als auch die mechanische Stabilität gewährleisten. Die Kontaktstellen an den bipolaren Enden der Kardiomyozyten werden Glanzstreifen oder auch *intercalated disc* genannt und bilden einen wesentlichen Unterschied zwischen den einkernigen Kardiomyozyten und den mehrkernigen Skelettmuskelzellen. Der Glanzstreifen ist bereits lichtmikroskopisch als eine den Herzmuskel treppenförmig durchziehende Struktur zu erkennen. Auf zytologischer Ebene konnten strukturelle Veränderungen der *intercalated disc* in an DCM erkranktem Myokard nachgewiesen werden. Dies führte zu der Hypothese, die DCM sei eine Erkrankung der kardialen Glanzstreifens³². Im transgenen Tiermodell konnte gezeigt werden, dass eine Veränderung der Adhäsionseigenschaften durch Modifizierung von verschiedenen Kadherinen der *intercalated disc* zu der Entwicklung einer DCM führen kann³³. Tatsächlich konnten auch Krankheitsgene für die dilatative Kardiomyopathie identifiziert werden, welche für Proteine der *intercalated disc* kodieren. Es handelt sich hierbei um Metavinculin und Desmoplakin^{15,34}.

Elektronenmikroskopisch lassen sich drei wichtige Strukturen der *intercalated disc* unterscheiden: *gap junction*, *adhaerens junction* und Desmosomen. Durch die Isolierung der beteiligten Proteine konnte der elektronenmikroskopisch nachweisbare Unterschied dieser Strukturen bestätigt werden.

1.5.1 *Gap junction*

Die *gap junction* besteht aus Connexonen, welche die Zellmembran durchspannen. Das Connexon setzt sich wiederum aus sechs Connexin-Molekülen zusammen. Das Zytoplasma zweier Kardiomyozyten ist über *gap junctions* miteinander verbunden, sodass es zu einem Austausch von Ionen kommen kann. *Gap junctions* gewährleisten durch den Ionentransport die kardiale Erregungsförderung. Von den verschiedenen Isoformen des Connexins ist im Myokard vornehmlich das Connexin-43 zu finden³².

1.5.2 *Adhaerens Junction*

Auch *adhaerens junctions* durchspannen als Zell-Zell-Kontakt die Zellmembran. Der transmembranäre Teil besteht aus einer Isoform des Kadherins, dem N-Kadherin. *N-*

Kadherin ist über α -Catenin intrazellulär an Plakoglobin und β -Catenin gebunden, welche die Verankerung an die intrazellulären Elemente des Aktinzytoskeletts gewährleisten. In den Kardiomyozyten ist dies die Verbindung zu den Myofibrillen. Durch ihre starke intrazelluläre Verankerung sind die *Adhaerens Junctions* maßgeblich für die Aufrechterhaltung der mechanischen Stabilität des Zellverbandes verantwortlich. Im Tiermodell zeigten Mäuse mit einer durch *Muscle-Lim-protein-knock out* induzierten DCM, eine drastische Überregulation von Proteinen, welche mit der *adhaerens junction* assoziiert sind ³⁵.

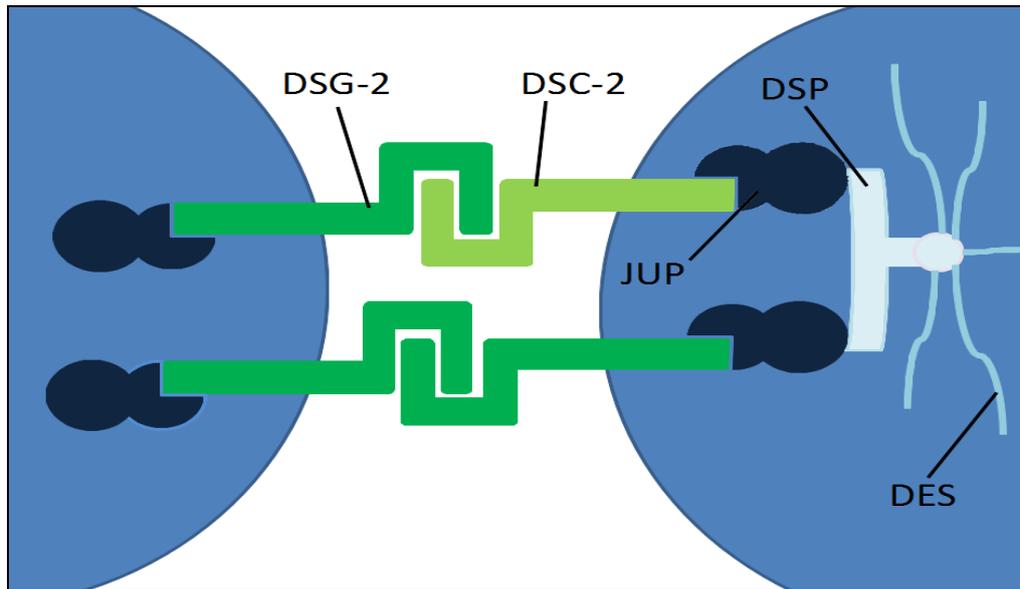
1.5.3 Desmosomen (*maculae adhaerentes*)

Desmosomen sind hoch entwickelte, scheibenförmige Strukturen mit einem Durchmesser von 0,1-0,5 μm im interzellulären Bereich von epithelalem und meningealem Gewebe. Sie sind außerdem an dendritischen Retikulumzellen in Lymphfollikeln und im Myokard zu finden ³⁶. Die Funktion der Desmosomen besteht vornehmlich in der mechanischen Stabilisierung des Zellverbandes. Hierzu dienen transmembranäre Proteine aus der Familie der Calcium-abhängigen Kadherine, die sogenannten desmosomalen Kadherine³². Es werden zwei desmosomale Kadherine, Desmocollin (DSC) und Desmoglein (DSG), unterschieden. Diese sind wiederum in verschiedenen Isoformen (DSC 1-3 bzw. DSG 1-4) im Organismus wiederzufinden. Die auch in den Desmosomen des Myokards exprimierten DSC2 und DSG2 sind in menschlichem Gewebe weit verbreitet, wohingegen andere Isoformen ausschliesslich in Epidermis und Gastrointestinaltrakt (GIT) vorkommen ³⁷.

Intrazellulär binden die desmosomalen Kadherine über ihr carboxy-terminales Ende an Plakoglobin, welches zusammen mit Plakophilin-2, Desmoplakin und Metavinculin den intrazellulären Plaque und die Verbindung zu den Intermediärfilamenten des Zytoskeletts bildet.

Abbildung 1.3

Schematische Darstellung der desmosomalen Komponenten



DSG-2: Desmoglein-2, DSC-2: Desmocollin-2, DSP: Desmoplakin, JUP: Plakoglobin, DES: Desmin. Nach Sen-Chowdhry et al. ³⁸

Verantwortlich für die Bindung des Proteins im intrazellulären Plaque sind 72 Aminosäuren der C-Domäne des Kadherins, welche in desmosomalen als auch in den klassischen Kadherinen konserviert sind (kadherin-typische Domäne) ³⁹. Extrazellulär binden desmosomale Kadherine mit ihrem N-terminalen Ende an desmosomale Kadherine der benachbarten Zelle und bilden so den extrazellulären Plaque. Hierbei kann es sowohl zu homophiler Bindung von zwei Molekülen Desmoglein bzw. Desmocollin als auch zu heterophiler Bindung von Desmoglein mit Desmocollin kommen.

Insbesondere eine heterophile Bindung ist von der Anwesenheit von Kalziumionen abhängig ⁴⁰. Die Bindung erfolgt über die extrazellulären *repeat unit* Domänen E1-E3, welche innerhalb der Isoformen des Proteins eine hohe Homologie zeigen ³⁷. DSG2 besitzt 15 kodierende Exons und liegt auf Chromosom 18q12.1 ⁴¹. Das Vorläuferprotein von 1.117 Aminosäuren bzw. das proteolytisch modifizierte Protein von 1.069 Aminosäuren stellt somit das größte Protein in der Familie der Kadherine dar ³⁷.

Veränderungen in den desmosomalen Kadherinen konnten bereits mit verschiedenen Erkrankungen in Verbindung gebracht werden. Die Isoformen 1,3 und 4 von DSG spielen in der Pathogenese verschiedener dermatologischer Erkrankungen eine

wichtige Rolle ⁴²⁻⁴⁴. Mutationen in den Isoformen 2 beider desmosomalen Kadherine konnten in mehreren Familien als Ursache für ARVC/D festgestellt werden ⁴⁵⁻⁴⁹.

2 Zielsetzung der Arbeit

Die Ätiologie der fDCM ist bis heute in vielen Fällen ungeklärt und es muss davon ausgegangen werden, dass bisher nicht bekannte Gene eine Rolle in der Pathogenese spielen.

In dem untersuchten Patientenkollektiv liegt eine genetische Ursache in Anbetracht mehrerer betroffener Familienmitglieder nahe. Die zu Grunde liegende Genmutation war zum Zeitpunkt der Untersuchung bei keinem der untersuchten Patienten bekannt.

Wie bereits beschrieben, konnten neuere Untersuchungen zeigen, dass unterschiedlichen Formen von Kardiomyopathien eine gemeinsame genetische Ursache haben können³¹.

Mutationen sowohl im Desmoglein-2^{45,47,49} und Desmocollin-2^{46,48} als auch in den anderen desmosomalen Genen wie Desmoplakin⁵⁰, Plakophilin-2⁵¹ und Plakoglobin^{52,53} konnten als Ursache für die arrhythmogene rechtsventrikuläre Dysplasie/Kardiomyopathie (ARVC/D) nachgewiesen werden. Die ARVC/D ist eine erbliche Erkrankung, die durch Dilatation des rechten und auch des linken Ventrikels sowie durch lipomatöse Degeneration zu ventrikulären Arrhythmien führt⁵⁴.

Auch für die Pathogenese der DCM wurde die zentrale Bedeutung der *intercalated disc* diskutiert³². Die Ausschaltung von Adhäsionsmolekülen der *intercalated disc* im Tiermodell führt zu einer Vergrößerung der kardialen Ventrikel⁵⁵. Der Verlust von DSG2 führt im Tierversuch zum frühen Tod der homozygoten, aber auch der meisten heterozygoten Knockout-Mäuse⁵⁶. Dies lässt zwar keine Rückschlüsse auf den kardialen Phänotyp zu, unterstreicht jedoch die wichtige Bedeutung des Proteins für den Organismus. Mutationen in den anderen desmosomalen Genen wie Desmoplakin¹⁵ und Metavinculin^{34,57} konnten als Ursache für DCM bereits nachgewiesen werden.

Es gibt also zahlreiche Hinweise, dass genetische Defekte im DSG2 Gen eine Rolle in der Pathogenese der DCM spielen.

Zielsetzung dieser Arbeit war daher die Detektion von krankheitsassoziierten genetischen Varianten im Desmoglein-2 bei Patienten mit fDCM.

Nach der Auswahl des Kollektivs verlief die Untersuchung in folgenden Schritten:

1. Isolierung der Lymphozyten-Desoxyribonukleinsäure (DNS) aus dem Patientenblut.
2. Amplifikation des gewünschten Genabschnitts mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR).
3. Sequenzierung der amplifizierten DNS und Identifikation von Varianten.
4. Untersuchung von Kontrollkollektiven und Familien der Betroffenen auf die detektierten kodierenden genetischen Varianten.

3 Material

3.1 Geräte

Tabelle 3.1
Geräte

Name	Hersteller
Automatische Sequenziermaschine 3100 Avant Analyzer	Applied
Enhanced Analysis System 429K Fotoanlage	Herolab
Gelelektrophoreseeinheit Multiphor II	Pharmacia
Gelelektrophorese-Kammer	ABGene
Gelelektrophorese-Kammer Horizon 58 Gibco BRL	GibcoBRL
Gelelektrophorese Stromversorgung PS 9009 TC	GibcoBRL
Gelelektrophorese Stromversorgung, Standard Power Pack	Biometra
Mikrowelle Micromat	AEG
PCR- Maschinen PTC-200	MJ-Research, Inc.
PCR-Maschinen T Professional	Biometra
Picofuge HF-120	Stratagene
Pipetten 0,1-1000µl	Biohit, Eppendorf
Pipette Achtkanal Multimate	Abimed
Reinstwasseranlage	MembraPure
Schüttler GFL 3015	GFL 3015
Thermostat Multi TempIII	Pharmacia Biotech
UV- Tisch Transilluminator TI 1	Biometra
Waage Kern 510	Kern
Zentrifuge MC 6400	Lab4you
Zentrifuge Rotanta 460R	Hettich
Nanodrop 1000	Thermo Scientific

3.2 Lösungen

Tabelle 3.2
Lösungen

Auftragungspuffer SSCP	
Formamid	47,5ml
NaOH(1M)	0,5ml
EDTA(1M)	1,0ml
adH2O	50ml
Zugabe je einer Spatelspitze Bromphenolblau und Xylencyanol.	

1%ige Silbernitratlösung	
Silbernitrat	5 g
dH2O (Seralpur)	500ml

TBE-Puffer (10x)	
Tris (Base)	54g
Borsäure	27,5g
EDTA(10M)	20ml
adH2O	500ml

Fixierlösung	
Eisessig	50 ml
dH2O (Seralpur)	500 ml

Silberlösung (lichtgeschützt):	
Silbernitratlösung 1%	50 ml
Formaldehyd-lsg. (37 %)	0,5 ml
dH2O (Seralpur)	500ml

Entwicklerlösung:	
Natriumcarbonat	12,5 g
Natriumthiosulphat-Lsg (2%)	0,5 ml
Formaldehyd-Lsg. (37 % w/v)	0,5 ml
dH ₂ O (Seralpur)	500 ml

Auftragspuffer (Lagerung bei 4°C)	
Stammlösung	1ml
Glycerol (30%)	9ml

4 Methoden

4.1 Klinische Untersuchung der Patienten

Für die Untersuchung wurde ein Kollektiv von 73 Patienten mit familiärer dilatativer Kardiomyopathie gewählt. Alle Individuen waren europäischer Abstammung, nicht miteinander verwandt und wurden im Zeitraum zwischen 1998-2006 als Patienten der Abteilung für Kardiologie der Universitätsklinik Marburg bzw. der Charité Campus Berlin Buch untersucht. Die Diagnose einer fDCM wurde entsprechend den *European guidelines*⁵ gestellt. Bei allen Patienten wurde neben Anamnese und körperlicher Untersuchung, ein Elektrokardiogramm (EKG) und eine echokardiografische Untersuchung durchgeführt. Zusätzlich wurde eine koronare Herzerkrankung angiografisch ausgeschlossen.

Zusätzlich wurden Angehörige der Patienten untersucht und Blut für die genetische Untersuchung gewonnen.

Als Kontrollgruppe diente ein Kollektiv von 180 Probanden ohne Nachweis einer linksventrikulären Dilatation, welches auf alle identifizierten kodierenden Varianten untersucht wurde.

Im Zuge einer Assoziationstudie wurden weitere Kollektive auf die Variante V56M untersucht. Es wurden zusätzlich 252 Probanden ohne linksventrikuläre Dilatation und erhaltener LVEF (>55%), 180 anonyme Blutspender und 538 Patienten mit gesicherter iDCM genotypisiert.

Alle Probanden hatten nach entsprechender Aufklärung der Teilnahme an der Untersuchung schriftlich zugestimmt.

4.2 Extraktion der DNS

Zur Gewinnung der DNS wurden 9 ml Blut in Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) abgenommen und bei -20°C gelagert. Die DNS- Extraktion wurde automatisiert mittels eines Autopure LS Extraktionsroboters durchgeführt. Die Schritte entsprechen dem aufgeführten manuellen Protokoll für die DNS-Isolation. Es wurden die von der Firma Genra Systems angebotenen Standardlösungen verwendet. Die DNS Konzentration wurde spektralphotometrisch mittels Nanodrop 1000 gemessen und für die PCR Arbeitslösung entsprechend mit Hydratationslösung verdünnt (50 ng/µl).

4.3 Die Polymerasekettenreaktion – *Polymerase chain reaction (PCR)*

Zur Sequenzierung wurde die DNS der 15 kodierenden Exons des DSG2 in 16 Fragmenten mit dem entsprechenden Primer mittels PCR amplifiziert. Die Primersequenzen wurden mit dem online Programm Primer3 (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi) erstellt und entsprechend den Herstellerangaben verdünnt. Die amplifizierten Fragmente wurden so gewählt, dass sowohl vor als auch nach dem jeweiligen Exon noch ein ausreichender intronischer Abschnitt zu erkennen war, sodass der ganze Bereich des Exons und die flankierenden intronischen Abschnitte sicher beurteilt werden konnten.

4.3.1 PCR- Ansatz

Tabelle 4.1

Ansatz für eine PCR

Substanz	Mengenangabe in μl
Betain 0,5M (Serva)*	1,0-3,0
dNTP 20mM (Biozym)	0,3
MgCl 25mM (Applied Biosys.)	1,5-2,0
10X PCR-Puffer (Applied Biosys.)	2,5
Primer F 5pmol/ μ l	1,6-2,0
Primer R 5pmol/ μ l	1,6-2,0
Taq-Polymerase 5U/ μ l (Applied Biosys.)	0,2
ad H2O dest.	23,0-24,0
+ 1,0-2,0 DNS (50ng/ μ l)	

*nur bei Exon 1 und 8

Die Konzentration von Primer, Magnesium und DNS wurde zum Erreichen eines optimalen PCR Ergebnisses angepasst. Bei der Amplifikation der Fragmente 8 und 1 wurde zur Optimierung zusätzlich Betain eingesetzt. Die H2O Menge wurde angepasst, sodass die Gesamtmenge des Ansatzes immer 25 μ l betrug.

Tabelle 4.2

Übersicht über die verwendeten Vor- bzw. Rückwärts Primer, Fragmentlängen und der ermittelten Annealing-Temperatur

Exon	Primersequenz	Fragmentlänge	Annealingtemperatur
1	F ACC CAA GGA CGT CAC GGT CCC R CCA AGA GGA TTT TCC GAA GCC	526bp	50°C
2	F AGA TTT CTC CTC GGG CAC T R TGC ACT GAA TAC CCC TGG AT	391bp	56°C
3	F GCC TCA TAG GAA ATA CGA AGC A R CCG GAA TGG GAA AGA GAA TC	463bp	56°C
4/5	F GGC TTT TGG CTA AGA TCA AAT C R CAG TGG GGA TAA AGT AAT CTT AGG T	575bp	56°C
6	F CCC ATT CAC GCT TAT GTC CT R TGG ACA GCA CAT CCC TAA AA	490bp	56°C
7	F GGA CTA AAA CCA GAA AGC CAG A R CCC TTC AAG CTG CAA AAC AT	336bp	56°C
8	F CAA GCT CAA GTT CAG ATT CGT R TTC CTT TCC AGC ACC AAC TT	422bp	56°C
9	F TGC TGC TAT ATT TCC TGT GCA T R TGC TGG ATT TGA AGG AAT GA	494bp	56°C
10	F GAG AGG GGC TTT TAG GAT GG R TCA ATG GTT TCT GAT GTT GGA A	373bp	56°C
11	F TTA GTA CCT TCT CCA CTC CAA A R GGT TCA GGA CCT CAT TTC AT	466bp	56°C
12	F GCA ATG AA GAA CAT TTG TGG A R GCA CTC AGA TTC CCA AAA GC	362bp	56°C
13	F GAC AAG TCC AGG AAG GGA CAT R CAC TTC CCT AGG CCC CTT TA	289bp	56°C
14	F CCT TCC TAT GCC CAC TTG AC R TCA CAT TCA CAT ACA AAT GTT CC	490bp	56°C
15a	F TTT CCC TGA TGG TTC CTT GT R CTA GAA GCC ATT GGG TCA GG	593bp	56°C
15b	F TCT GGC AGT AGC TTC CCA GT R TTA GGC ATG GCC AGA GTA GG	461bp	56°C
15b ²	F TCT GGC AGT AGC TTC CCA GT R CAGGATCACAGTGGTTGGTG	170bp	56°C
15c	F GTG GAT CGA ATC CTC TGG AA R GGCTCA TGA AAA ATC AGG TAC A	452bp	56°C

²zusätzlicher Primer für Kontroll-SSCP (siehe Kapitel 5.2.2.6); bp: Basenpaare

4.3.2 PCR-Programm

Die Annealingtemperaturen für die PCR der verschiedenen Exons wurden mittels PCR-Temperaturgradienten ermittelt und sind Tabelle 4.2 zu entnehmen. Im Falle von Exon 1 wurde zur Optimierung die Zyklenanzahl um fünf Zyklen erhöht.

Tabelle 4.3
PCR-Programm

Schritt	Temperatur	Zeit in Minuten	Funktion
I	90°C	02:00	Start der Denaturierung
II	94°C	01:00	Initiale Denaturierung
III	Annealingtemperatur	00:30	Primer Annealing
IV	73°C	01:00	Elongation
V	94°C	00:15	Denaturierung
VI	Wiederholung des Schrittes III-V (34x)	34 mal	Wiederholung
VII	Annealingtemperatur	00:15	Primer Annealing
VIII	72°C	05:00	Finale Elongation
IX	4°C	Unbegrenzt	Ende

Die Überprüfung der hergestellten PCR-Produkte erfolgte mittels Gelelektrophorese auf zweiprozentigem Agarosegel.

Tabelle 4.4
Agarosegel

Agarose-Gel (2%)	
Agarose	0,6g
TBE (1x)	30ml
Ethidiumbromid	1µl

In die Taschen des Gels wurden 3 µl PCR-Produkt mit 3 µl Auftragspuffer gegeben. Anschließend wurden die Produkte je nach Größe für 25-40 Minuten in der Gelelektrophorese-Kammer bei 80 V aufgetrennt. Zur Größenabschätzung wurde parallel ein DNS Marker (MBI Fermentas Marker VIII) aufgetragen. Die 13

Referenzbanden des Markers zeigten Fragmentgrößen von 63-1116 bp. Die Auswertung erfolgte auf einem Transluminator UV-Tisch. Die einzelnen Gele wurden hier zur späteren Auswertung unter UV-Licht abfotografiert. Bei ausreichender Intensität der Banden wurden die Proben für die Sequenzierung weiterverarbeitet.

4.4 DNS-Sequenzierung

4.4.1 Enzymatische Aufreinigung der Proben

Ansatz pro Probe

Exonuklease	0,09 µl
Shrimp Alkaline Phosphatase	0,32 µl
H ₂ O dest	2,59 µl
<i>PCR Produkt</i>	<i>7,00 µl</i>

Es folgte die Inkubation im Thermocycler (Einstellung: 37°C für 30min, 72°C für 15 min, 4°C unbegrenzt).

4.4.2 Cycle Sequencing

Ansatz pro Probe:

Big Dye Terminator (Applied Biosys.)	0,50 µl
5x Seq.-Buffer (Applied Biosys.)	1,75 µl
Primer F oder R (0,5pmol/ µl)	1,00 µl
H ₂ O	4,75 µl
enzymatisch aufgereinigtes PCR-Produkt	2,00 µl

Anschliessend erneute Inkubation im Thermocycler.

Tabelle 4.5

Cycle Sequencing Programm im Thermocycler

Schritt	Temperatur	Zeit
I	96°C	00:01:00h
II	96°C	00:00:10h
III	50°C	00:00:30 h
IV	60°C	00:04:00 h
V	Wiederholung des Schrittes 2 bis 4	25 mal
VI	4°C	unbegrenzt

4.4.3 Aufreinigung mit der Sephadexfilterplatte

Die 96 wells der Sephadexfilter-Platte (Filter Plates, Multiscreen, Millipore) wurden mittels Füllhilfe mit Sephadex Pulver (Sephadex G-50, Healthcare Bio-Sciences) gefüllt. In jedes well wurden anschließend 300 µl H₂O (Aqua Serapur) eingefüllt. Der Ansatz wurde mindestens 3 h bei Raumtemperatur oder maximal 2 Tage bei +4°C quellen gelassen. Nach dem ersten Zentrifugieren (970g) wurde das abzentrifugierte Wasser verworfen und es wurden pro well 150 µl H₂O (Aqua Serapur) nachgefüllt, und die Platte erneut zentrifugiert.

Anschließend wurden 10 µl Sequenzierprodukt in das jeweilige well pipettiert. Vor dem nächsten Zentrifugationsschritt wurde nun die mit 13 µl HiDi-Formamid (Applied Biosystems) pro well gefüllte Ladeplatte (Optical 96-Well Reaction Plate, Applied Biosystems) unter die Sephadexplatte gesetzt, sodass das Sequenzierprodukt in die Ladeplatte einzentrifugiert wurde. Die Ladeplatte wurde anschließend mit dem Plate Septa (Applied Biosystems) verschlossen und sequenziert bzw. bei -20°C bis zur Sequenzierung gelagert.

4.4.4 Automatische DNS-Sequenzierung mit dem ABI 3100 AVANT

Das DNS-Sequenzierungssystem ABI-3100 Avant ist ein Kapillar-Elektrophorese-Detektions-System, welches fluoreszenzmarkierte Nukleotide separiert und identifiziert. Das System besteht aus einer Kapillar-Elektrophorese-Einheit (4 Kapillaren) mit einem variablen Detektionsmodul. Die zur Anregung der Fluoreszenz nötige Energie wird mittels eines Laserstrahls auf die zu detektierende Probe gerichtet. Die Signale der so angeregten Fluoreszenzfarbstoffe werden im Gerät durch die Optik des Detektionsmoduls auf ein Filtersystem fokussiert, welches auf die Emissionsmaxima der 4 basenspezifischen Fluoreszenzfarbstoffe abgestimmt ist. Die Sequenzierreaktion wurde mit Dye-markierten Terminatoren (Big Dye Terminatoren) und den zu dem Fragment gehörigen Primer durchgeführt. Je nach gewünschter Leserichtung konnte der Sense- oder Antisense-Primer verwendet werden. Die Elektropherogramme wurden am Computer mittels Sequencher© Software ausgewertet. Zur Detektion genetischer Varianten wurde die DNS-Sequenz mit einer Referenzsequenz (NM_001943) verglichen.

4.5 RFLP-Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus

Mit RFLP lassen sich genetische Varianten schnell und sicher bestätigen⁵⁸. Die Methode beruht auf der Tatsache, dass sich durch den Austausch eines Nukleotids Erkennungssequenzen für bestimmte Restriktionsenzyme ändern. Auf diese Weise können genetische Varianten dazu führen, dass bestimmte Restriktionsenzyme nicht mehr in der Lage sind an die DNS zu binden, um diese zu schneiden. Werden DNS-Proben mit dem entsprechenden Restriktionsenzym inkubiert, so wird also nur die Variante bzw. nur der Wildtyp geschnitten. Schneidet das Enzym, so ergeben sich zwei kürzere Fragmente die durch Auftrennung mittels Gelelektrophorese von nicht geschnittenen DNS-Proben unterschieden werden können. Die geeigneten Restriktionsenzyme wurden mit der Sequencher Software identifiziert.

Das mit Restriktionsenzym versetzte PCR-Produkt wurde entsprechend der Herstellerangabe für 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde der gesamte Ansatz von 10 µl vermischt mit 3 µl PCR-Auftragspuffer auf 2%igem Agarosegel aufgetragen und elektrophoretisch getrennt. Die Auswertung der Bandenmuster erfolgte auf dem Transluminator UV-Tisch.

Tabelle 4.6
Ansatz für analytischen Restriktionsverdau

Restriktionsenzym	0,1 µl
NEB Puffer	1 µl
H2O	6,9 µl
+ 2µl PCR-Produkt	

4.6 SSCP- Single stranded conformation polymorphism

Die SSCP ist eine Methode zur Auftrennung von DNS-Einzelsträngen nach deren Konformation und kann als sensitive Methode zur Mutationsdetektion genutzt werden^{59,60,61}. Sequenzunterschiede bedingen Änderungen der Konformation des DNS-Strangs und damit der Wanderungsgeschwindigkeit der Moleküle im Gel. Die Sensitivität der SSCP kann durch Veränderung der Gelzusammensetzung und Temperatur verbessert werden. Die SSCP wurde bei zwei Genvarianten eingesetzt, um deren Häufigkeit im Kontrollkollektiv nachzuweisen, da für diese Varianten kein geeignetes Restriktionsenzym erhältlich war. Zunächst mussten geeignete SSCP- Bedingungen ermittelt werden, unter welchen ein Unterschied der Banden sicher nachzuweisen war. Hierzu wurden jeweils 12%- bzw. 10 %-Polyacrylamid (PAA)-Gele mit Lauftemperaturen

von 10°C bzw. 20°C getestet. Die Ergebnisse wurden bezüglich besserer Differenzierung zwischen Variante und Wildtyp bewertet. Die SSCP der Kontrollproben erfolgte unter den ermittelten Bedingungen mit mindestens einer positiven Kontrolle.

4.6.1 Gießen der SSCP Gele

Tabelle 4.7
SSCP-Gele

12% Polyacrylamid-Gel	
10 x TBE-Lösung	1,8ml
40% PAA-Lösung	9,4ml
dH2O Seralpur	19,8ml

10% Polyacrylamid-Gel	
10 x TBE-Lösung	1,8ml
40% PAA-Lösung	7,8ml
dH2O Seralpur	21,4ml

Für die Polymerisation wurden 24 µl TEMED (Serva/Pierce) und 48 µl Ammoniumpersulfat (Pulsone/Pharmacia Biotech) zugegeben und die Flüssigkeit anschließend zügig in die vorbereitete Gießvorrichtung eingefüllt. Nach ein bis zwei Stunden wurden die Gele entnommen und sofort verarbeitet oder bei 4°C gelagert.

Die PCR-Proben wurden entsprechend ihrer Konzentration (Bandenintensität) 1:1, 1:2 bzw. 2:1 mit SSCP-Auftragspuffer verdünnt. Pro Gel wurde zusätzlich in einem Slot Marker VIII als Referenz aufgetragen. Bevor die Proben auf das Gel aufgetragen werden konnten, mussten sie für 5 Minuten bei 95°C denaturiert werden. Anschließend wurden die Proben auf Eis gestellt. Es wurden 8,5 ml des Ansatzes in die Geltaschen pipettiert. Auf jedes Gel konnten bis zu 46 Proben aufgetragen werden. Der pro Reihe einmal aufgetragene DNS-Molekulargewichtsmarker (Roche-Marker VIII) diente zur Überprüfung der Silberfärbung. Die beiden äußeren Slots wurden nur mit Auftragspuffer gefüllt.

4.6.2 SSCP-Elektrophorese und Färbung der Gele

Die Elektrophorese wurde für 75 min. bei konstanter Leistung von 35 Watt pro Gel gefahren. Nach Beendigung des Laufs wurde das Gel abgenommen und der Silberfärbung unterzogen. Die einzelnen Schritte der Silberfärbung wurden unter kontinuierlichem Schütteln durchgeführt

1. Fixierung 20 min.
2. Waschen: dreimal mit dH₂O (Seralpur) 2 min.
3. Silberfärbung (vor Licht geschützt) 20 min.
4. Waschen: einmal mit dH₂O (Seralpur) 20 sec.
5. Entwicklung 7-9 min.
6. Stoppen der Silberfärbung 10 min.
7. Konservierung 10 min.

Das Gel wurde aus der Glasschale auf eine zuvor mit Alkohol gereinigte Glasplatte gelegt und mit in Wasser gequollener Cellophanfolie überzogen. Nach 24 Stunden konnten die Banden ausgewertet werden

4.7 Statistische Analyse

Alle statistischen Berechnungen wurden mit dem Programm BIAS (www.bias-online.de) mit freundlicher Genehmigung des biostatistischen Institus der Johann-Wolfgang Goethe Universität Frankfurt durchgeführt.

Die Häufigkeiten der detektierten Varianten sind in absoluten Zahlen und in Prozenten angegeben. Die Verteilung der Varianten in den verschiedenen Kollektiven wurde unter Verwendung des Chi-Quadrat-Testes auf signifikante Unterschiede untersucht. Für Fallzahlen <5 wurde der zweiseitige exakte Test nach Fisher verwendet. Stetige Variablen (z.B. LVEDD und LVEF) wurden auf Normal (Gauß) -Verteilung überprüft und sind als Durchschnittswerte mit Standardabweichung (SA) wiedergegeben. Die Werte wurden für die Genotyp-Phänotyp-Studie wurden mit Hilfe des zweiseitigen, gepaarten T-Tests miteinander verglichen.

5 Ergebnisse

5.1 Klinische Untersuchung der Index-Patienten und Familienangehörigen

Insgesamt konnten 73 Patienten mit fDCM in die Studie eingeschlossen werden (16 weibliche und 57 männliche Patienten). Der älteste Patient wurde im Jahr 1928, der jüngste im Jahr 1992 geboren. Das Alter zum Zeitpunkt der Erstdiagnose lag zwischen 4 Monaten und 67 Jahren. Alle Patienten hatten eine LVEF < 50% und einen LVEDD > 57mm. Bei 51 Patienten konnten Herzrhythmusstörungen nachgewiesen werden. Hierzu wurden Patienten mit Vorhofflimmern, krankem Sinusknoten-Syndrom, mehr als 1000 ventrikulären Extrasystolen pro Stunde oder AV-Blockierungen bzw. Patienten mit Schrittmacher (PM) oder automatischem implantierbarem Defibrillator (AICD) gezählt. Die durchschnittliche Anzahl der betroffenen Familienangehörigen betrug 1,9 ($\pm 1,2$). Für alle Indexpatienten wurden Familienstammbäume erstellt. In sechs Fällen konnten mehr als zwanzig Verwandte ausfindig gemacht werden. In jeder Familie konnte mindestens ein von DCM betroffener Angehöriger identifiziert werden. In neun Familien konnten zwei, in fünf Familien drei, in zwei Familien vier und in vier Familien fünf betroffene Familienangehörige identifiziert werden. Eine Familie wies sechs betroffene Angehörige auf.

Tabelle 5.1
Klinische Eigenschaften des untersuchten Patientenkollektivs

Geschlecht	w:16, m:57
Anzahl der betroffenen Angehörigen	1,9 ($\pm 1,2$)
Alter bei Erstdiagnose [Jahre]	42 (± 17)
BMI	25,71
LVEDD [mm]	67 (± 7)
LVEF [%]	31,9 ($\pm 10,6$)
FS [%]	17,5 (± 5)
Herzrhythmusstörungen	51 (70%)
AICD/PM o.ä.	29 (39%)
Herztransplantation	2*
Verstorben	4

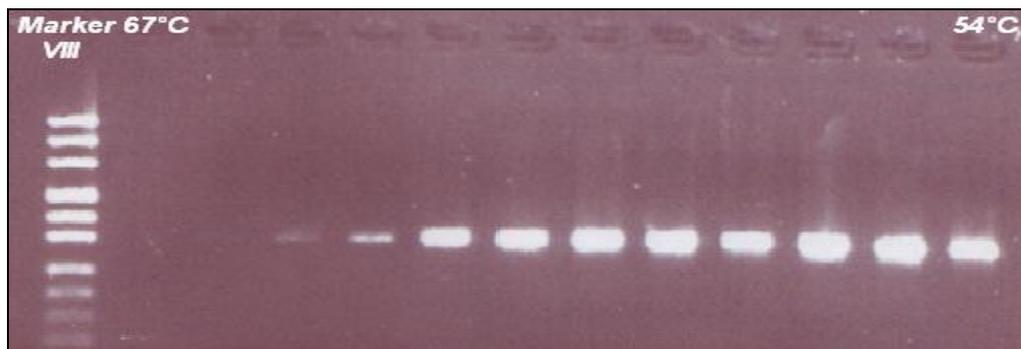
*Mittelwerte mit der entsprechenden Standardabweichung(\pm). *Ein weiterer Patient wurde mit einer Acorn® Plastik versorgt.*

5.2 Genetische Analyse

Zunächst wurde die jeweils optimale Annealingtemperatur für die PCR mit Hilfe des Gradientencyclers ermittelt. Der Temperaturgradient wurde zunächst auf 54°C - 67°C eingestellt. Es ergab sich für die Fragmente 2 bis 15c eine optimale Annealingtemperatur von 56°C. Für Exon 1 wurde die optimale Temperatur nach Herabsetzen des Temperaturgradienten bei 50°C gefunden.

Abbildung 5.1

Gelbild nach PCR (Fragment Exon7) im Gradientencycler



Als geeignete Annealingtemperatur wurde 56°C gewählt.

Nachdem die richtige Annealingtemperatur (Tabelle 4.2) festgesetzt war, konnten die DNS der Patienten eingesetzt und die Fragmente des DSG2 Gens amplifiziert werden. Alle Fragmente konnten nach erfolgreichem Einstellen der PCR-Bedingungen in ausreichender Qualität amplifiziert werden.

Insgesamt wurden 15 genetische Varianten identifiziert. Acht Varianten waren zu diesem Zeitpunkt bereits bekannt und in den Online-Datenbanken veröffentlicht (rs2276149, rs3737378, rs2230223, rs2230234, rs2276150, rs2278792, rs1042769, rs1791235). Von diesen lagen drei in intronischen (rs2276149, rs3737378, rs2276150) und fünf in exonischen Bereichen (rs2230223, rs2230234, rs2278792, rs1042769, rs1791235). Von den fünf exonischen Varianten waren drei nicht-kodierende (synonyme) Polymorphismen (rs2230223, rs1042769, rs1791235) und zwei kodierende (nicht-synonyme) Polymorphismen (rs2230234, rs2278792). Sieben Varianten waren zum Zeitpunkt der Analyse noch unbekannt. Von diesen lagen zwei im 5' untranslatierter Bereich (UTR), eine im Intron 8 und vier im exonischen Bereich von DSG2 (Exon 3, 5, 14 und 15). Alle neuen exonischen Varianten waren kodierend (V56M, V158G, E713K, V209G)

Ein Kontrollkollektiv (n=180) wurde auf alle kodierenden Varianten untersucht.

5.2.1 Intronische Varianten und nicht-kodierende exonische Varianten

Es wurden insgesamt vier Varianten in den flankierenden intronischen Bereichen nachgewiesen. Die Varianten lagen in Intron 2, 7, 8 und 11. Bis auf die Variante in Intron 8 waren alle zum Zeitpunkt der Analyse als intronische *Single nucleotide polymorphisms* (SNPs) bereits beschrieben (rs2276149, rs3737378, rs2276150). Aller Wahrscheinlichkeit nach handelt es sich um harmlose genetische Polymorphismen.

Zwei weitere Varianten lagen im 5`UTR-Bereich. Diese konnten jeweils in einem Patienten nachgewiesen werden und sind bislang nicht beschrieben worden.

Sämtliche Varianten und deren Häufigkeit im fDCM-Kollektiv sind Tabelle 5.2 zu entnehmen.

Drei Varianten lagen in exonischen Bereichen von DSG2, eine in Exon 8, und zwei in Exon 15. Diese drei Varianten betreffen die dritte Base innerhalb des Kodons (Basentriplett) und haben keine Auswirkung auf die Aminosäuresequenz. Alle drei Varianten waren zum Zeitpunkt der Analyse bereits bekannt (rs2230223, rs1042769, rs1791235). Bei Variante N287N (rs2230223) kommt es zum Austausch von Cytosin durch Thymin an Position c.904 im Exon 8 von DSG2. Das Basentriplett AAC wird zu AAT. Beide kodieren die Aminosäure Asparagin (N). Die Variante konnte bei 32 Patienten in heterozygoter sowie bei zehn Patienten in homozygoter Form nachgewiesen werden. Die Verteilung dieser Variante lag im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht. Zwei weitere nicht kodierende Varianten konnten in Exon 15 nachgewiesen werden. Bei der Variante T834T wird Guanin durch Adenin an Position c.2548 ersetzt, wodurch das Basentriplett von ACG in ACA geändert wird. Das Triplet ACA kodiert wie auch ACG für die Aminosäure Threonin (T). Die Variante konnte im Kollektiv in 11 Fällen heterozygot nachgewiesen werden und ist ebenfalls bereits beschrieben (rs1042769). Die Variante V1108V beruht auf einem Basenaustausch von Thymin durch Cytosin an Position c.3364. Das Triplet verändert sich entsprechend von GTT zu GTC. Die Aminosäure Valin (V) an Stelle 1108 des Proteins bleibt auch in diesem Fall erhalten. Sie konnte in 31 Fällen heterozygot und in 7 Fällen homozygot identifiziert werden. Auch diese Variante lag im Hardy-Weinberg- Gleichgewicht.

Da die Varianten nicht kodierend sind und zudem zum Großteil bereits als genetische Polymorphismen beschrieben sind ist eine Bedeutung in der Pathogenese der DCM unwahrscheinlich. Die detektierten nicht kodierenden Varianten wurden im Zuge dieser Arbeit daher nicht weiter untersucht.

5.2.2 Kodierende Varianten in DSG2

Insgesamt konnten sechs kodierende Varianten identifiziert werden, deren Vorkommen in einem Kontrollkollektiv von 180 kardial gesunden Patienten (Kontrollkollektiv) überprüft wurde.

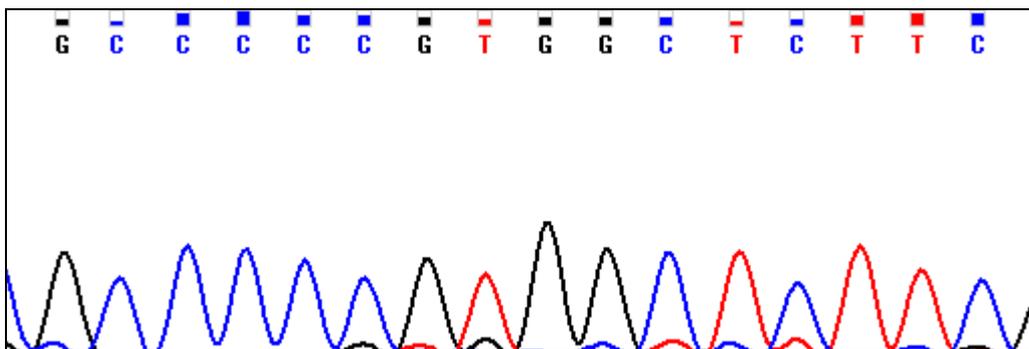
5.2.2.1 Die Variante DSG2 V56G

In Exon 3 wurde eine Variante detektiert. Guanin wird an Stelle c.209 durch Adenin ersetzt. Das Basentriplett ändert sich entsprechend von GTG in ATG. Es kommt zu einer Änderung der Aminosäuresequenz des Proteins. Valin (V) wird an Position 56 durch Methionin (M) ersetzt. Diese Variante konnte in einem Patienten des fDCM Kollektivs nachgewiesen werden. Es handelt sich um eine zu diesem Zeitpunkt in den Datenbanken nicht bekannte Variante. Interessanterweise ist der betroffene Patient homozygoter Träger der Variante.

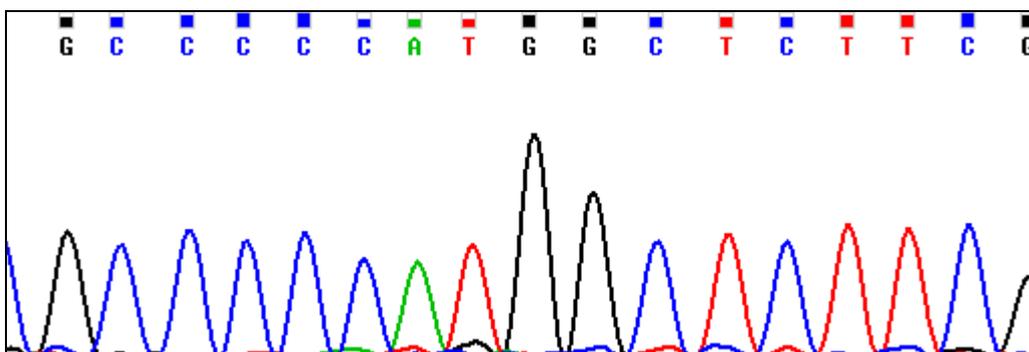
Abbildung 5.2

DNS-Sequenzierung der Variante c.209 G>A

(A)



(B)



DNS Sequenzierung des Wildtyps (A) und des homozygoten Variantenträgers (B). Guanin (schwarz) wird durch Adenin (grün) ersetzt.

Das Kontrollkollektiv wurde mittels enzymatischem Restriktionsverdau auf die Variante untersucht. Hierfür konnte das Restriktionsenzym *Nco I* verwendet werden, welches die Variante nicht schneidet, aber den Wildtyp.

Tabelle 5.2

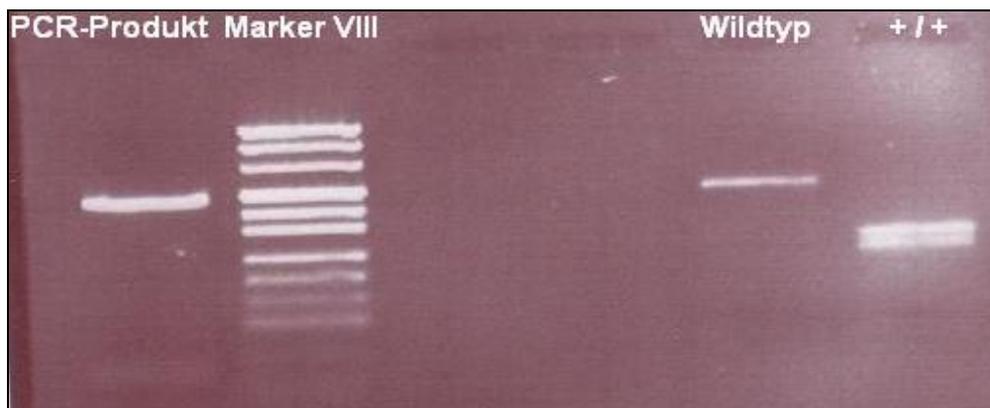
NCOI

Restriktionenzym	Quelle	Erkennungssequenz
<i>NCOI</i>	E.Coli Stamm mit geklontem <i>Nco I</i> - Gen aus <i>Nocardia corallina</i>	▼ 5'...C CATGG...3' 3'...GGTAC C...5' ▲

Das Restriktionsenzym *Nco I* schneidet nur die Variante (ATG) nicht den Wildtyp (GTG).

Abbildung 5.3

RFLP Analyse der Variante V56M



Es kann deutlich zwischen Wildtyp und dem homozygoten Träger der Variante V56M (+/+) unterschieden werden.

In den 180 Kontrollprobanden konnte die Variante nicht nachgewiesen werden. Die Variante V56G wurde daher als möglicherweise pathogen eingestuft. Weiterführende Untersuchungen bezüglich dieser Genvariante sind in Kapitel 5.3 bzw. 5.4 beschrieben.

5.2.2.2 Die Variante DSG2 V158G

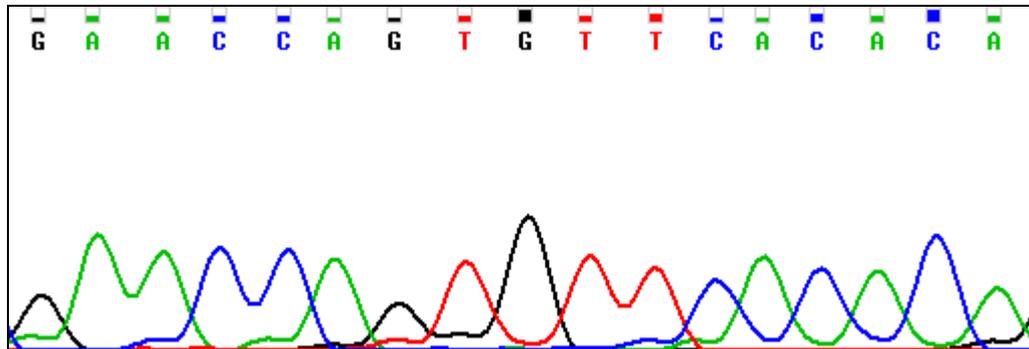
In Exon 5 wurde eine weitere kodierende Variante identifiziert. Thymin wird an Stelle c.516 durch Guanin ersetzt. Das Basentriplett verändert sich von GTG zu GGG, wodurch ein Aminosäurenaustausch von Valin (V) zu Glyzin (G) an Position 158 verursacht wird. Auch diese Variante war zum Zeitpunkt der Analyse nicht in den

Datenbanken beschrieben. Die V158G Variante wurde in dem Patientenkollektiv in drei Fällen detektiert.

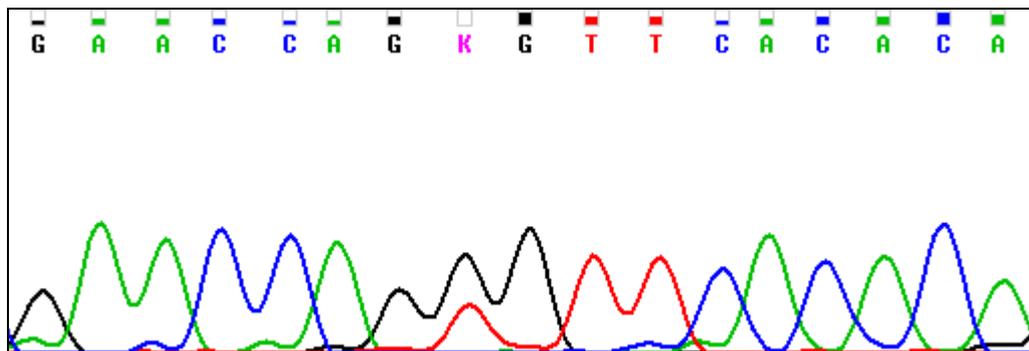
Abbildung 5.4

DNS-Sequenzierung der Variante c.516 T>G

(A)



(B)



DNS Sequenzierung des Wildtyps (A) und eines heterozygoten Trägers der Variante (B). Thymin (rot) wird durch Guanin (schwarz) ersetzt.

Zur Untersuchung des Kontrollkollektivs auf die Variante wurde ebenfalls ein analytischer Restriktionsverdau verwendet. Das Enzym *BsaJ* I schneidet die DNS mit der Variante nicht jedoch den Wildtyp. Die geschnittene Variante lässt sich durch die Ausbildung zweier Banden nach Elektrophorese klar vom Wildtyp unterscheiden.

Tabelle 5.3

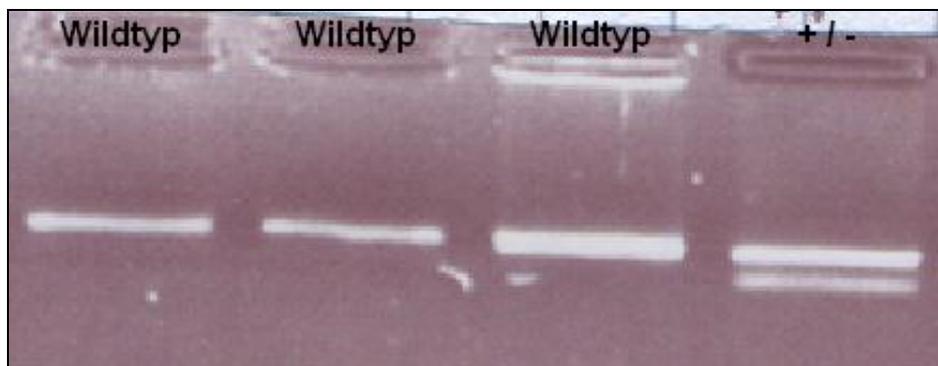
BSAJI

Restriktionsenzym	Quelle	Erkennungssequenz
<i>BsaJI</i>	Bacillus stearothermophilus J.	5'...C CNNGG...3' 3'...GGNNC C...5'

Das Restriktionsenzym *BsaJ I* schneidet nur die Variante (GGG) nicht den Wildtyp (GTG).

Abbildung 5.5

RFLP-Analyse der Variante V158G



Gelelektrophorese des Fragments Exon 4/5 nach analytischem Restriktionsverdau mit *BsaJ II*. Nur die Variante wird geschnitten und lässt sich so deutlich vom Wildtyp unterscheiden.

Auch in den Kontrollen konnte die Variante viermal detektiert werden. Die Variante ist demnach wahrscheinlich nicht pathogen und wurde daher nicht weiter untersucht.

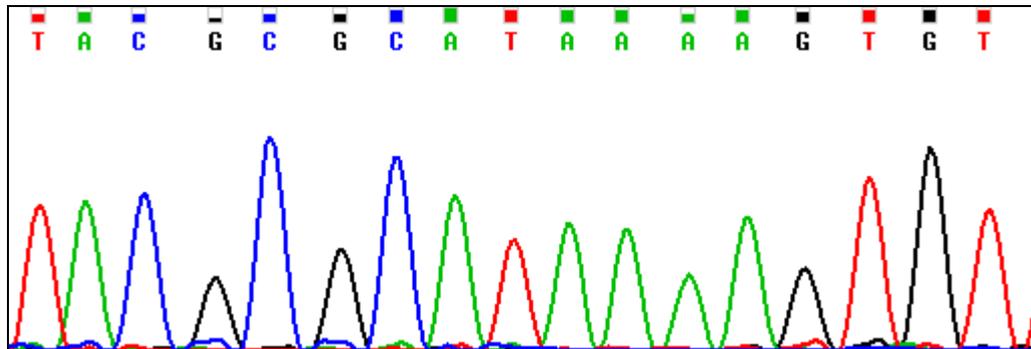
5.2.2.3 Die Variante DSG2 I293V

In Exon 8 wurde eine kodierende Variante gefunden. Adenin wird an Stelle c.920 durch Guanin ersetzt. Durch die Veränderung des Basentriplets ATA in GTA kommt es zu einem Austausch von Isoleucin (I) zu Valin (V) an Position 293 (I293V).

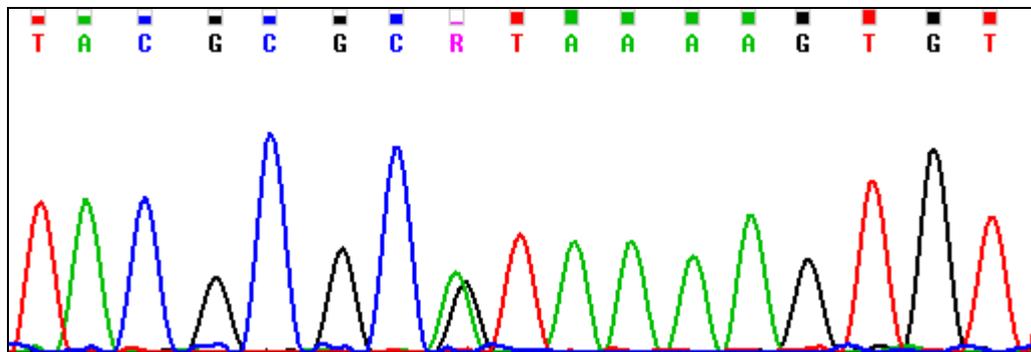
Abbildung 5.6

DNS-Sequenzierung der Variante c.920 A>G

(A)



(B)



DNS Sequenzierung des Wildtyps (A) und eines heterozygoten Trägers der Variante (B). Adenin (grün) wird durch Guanin (schwarz) ersetzt.

Die Variante ist bereits beschrieben (rs2230234) und konnte im dem Kollektiv zehnmal in heterozygoter Form detektiert werden. Das Kontrollkollektiv wurde ebenfalls mittels analytischem Restriktionsverdau auf die Variante untersucht. Das Enzym *Msl I*, welches nur den Wildtyp schneidet, konnte zum Nachweis verwendet werden

Tabelle 5.4

Msl I

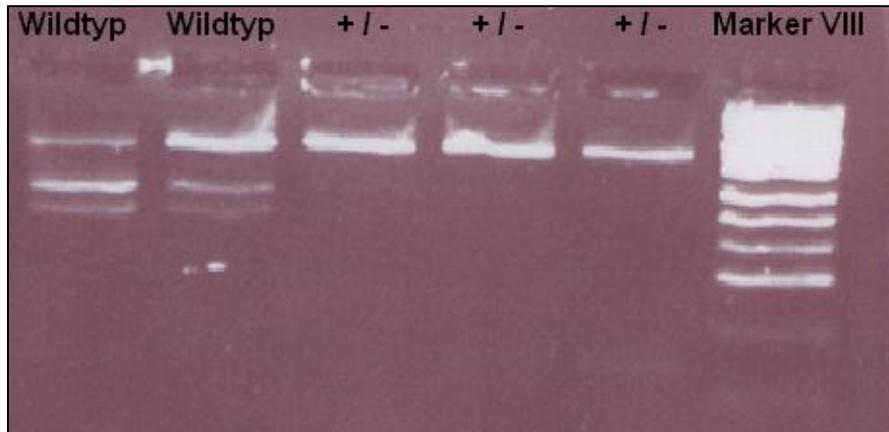
Restriktionenzym	Quelle	Erkennungssequenz
<i>Msl I</i>	E. Coli Stamm mit geklontem Msl I -Gen aus <i>Moraxella osloensis</i>	▼ 5'..CAYNN NNRTG...3' 3'..GTRNN NNYAC..5' ▲

Das Restriktionsenzym *Msl I* schneidet nur den Wildtyp (ATA) nicht die Variante (GTA).

N= A, C, G oder T; Y= C oder T; R =A oder G

Abbildung 5.7

RFLP-Analyse der Variante I293V



Gelelektrophorese des Fragment Exon 8 nach analytischem Restriktionsverdau mit Msl I. Nur Allele des Wildtyps werden geschnitten und lassen sich so von Allelen mit der Variante unterscheiden.

Die Variante wurde in den Kontrollen in 20 Fällen heterozygot nachgewiesen und wurde daher nicht weiter untersucht.

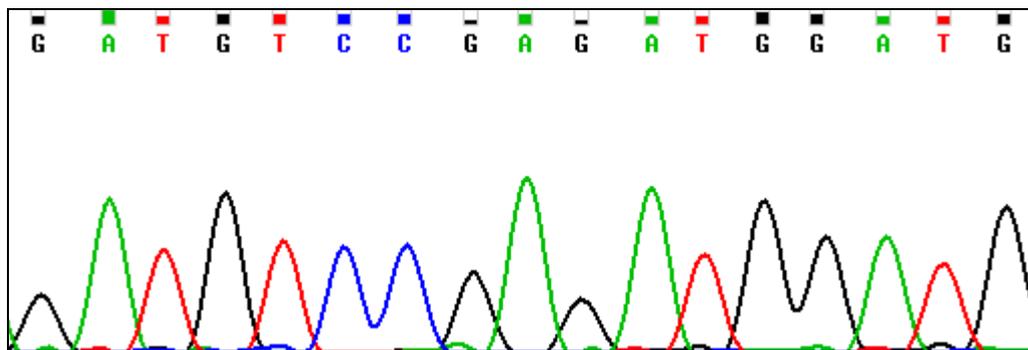
5.2.2.4 Die Variante DSG2-E713K

Ein Austausch von Guanin zu Adenin in Exon 14 von DSG an Position c.2180 bewirkt eine Änderung des Basentriplets von GAG zu AAG.

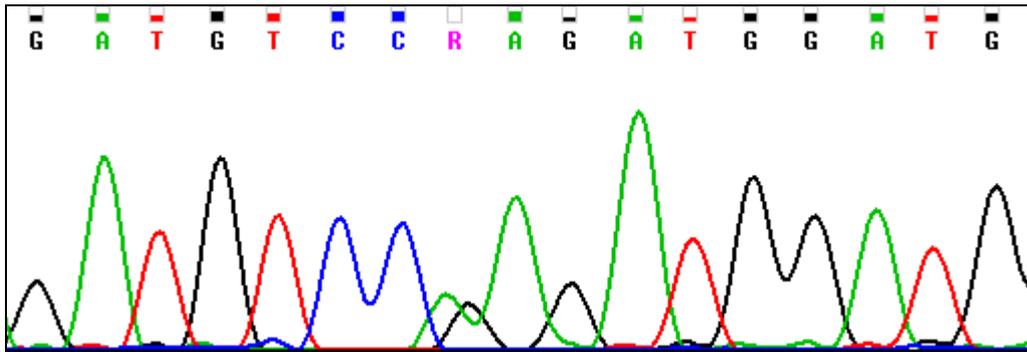
Abbildung 5.8

DNS-Sequenzierung der Variante c.2180 G>A

(A)



(B)



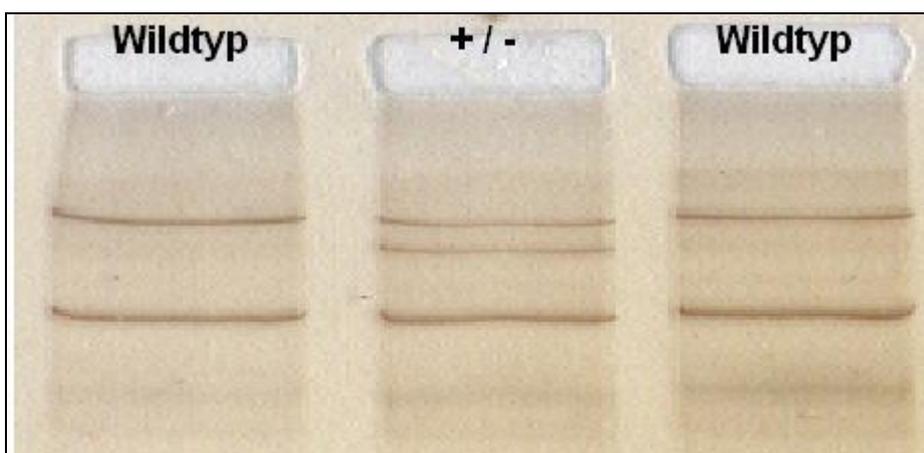
DNS Sequenzierung des Wildtyps (A) und eines heterozygoten Trägers der Variante in Exon. Guanin (schwarz) wird an Stelle c.2180 durch Adenin (grün) ersetzt.

Die Variante führt zu einer Änderung der Aminosäuresequenz von Lysin (E) an Position 713 zu Glutamin (K). In dem fDCM-Kollektiv konnten insgesamt zwölf heterozygote Träger dieser Variante identifiziert werden.

Da für die Variante kein spezifisches Restriktionsenzym gefunden werden konnte, wurde die Häufigkeit in dem Kontrollkollektiv mittels SSCP durchgeführt. Nach Einstellen der Bedingungen zeigte sich, dass sich die Variante durch Elektrophorese bei 20°C in einem 12% PAA-Gel am besten vom Wildtyp unterscheiden lässt. Abbildung 5.9. zeigt die Variante und zwei Wildtypen auf dem entsprechenden Gel nach Silberfärbung.

Abbildung 5.9

SSCP-Analyse der Variante E713K



Nachweis der Variante E713K nach Elektrophorese auf dem SSCP-Gel (PAA 12%, 20°C) nach abgeschlossener Silberfärbung. Die Variante lässt sich vom Wildtyp klar abgrenzen.

Die Variante konnte im Kontrollkollektiv zwanzigmal nachgewiesen werden. Es handelt sich somit um eine bislang unbekannte genetische Variante im Exon 14 des DSG2.

5.2.2.5 Die Variante DSG2-R773K

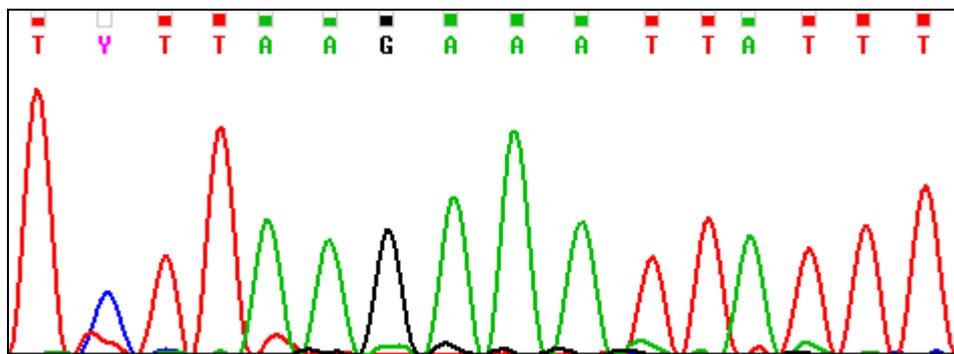
In Exon 14 fand sich eine zweite kodierende Variante. Der Austausch von Guanin durch Adenin an Position c.2361 liegt an der zweiten Position des Basentriplets (AGA wird zu AAA). Das Triplet kodiert somit an Position 773 des Proteins nicht mehr Arginin (R) sondern Lysin (K).

32 Patienten des fDCM Kollektivs sind positiv für diese Variante. Von diesen sind neun homozygote Träger.

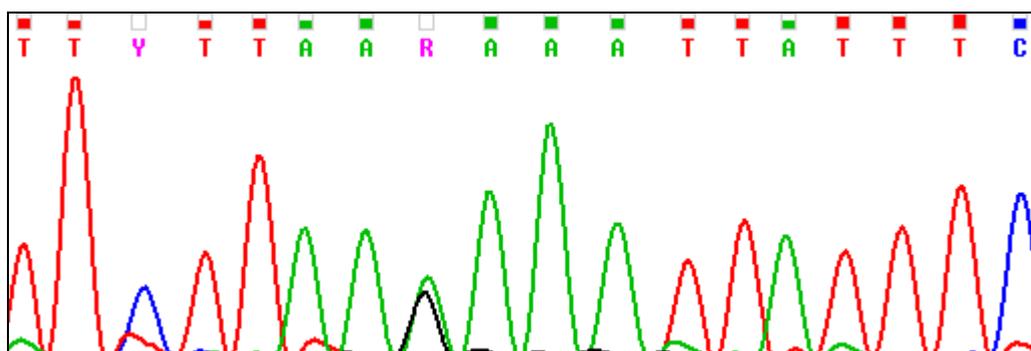
Abbildung 5.10

DNS-Sequenzierung der Variante c.2361 G>A

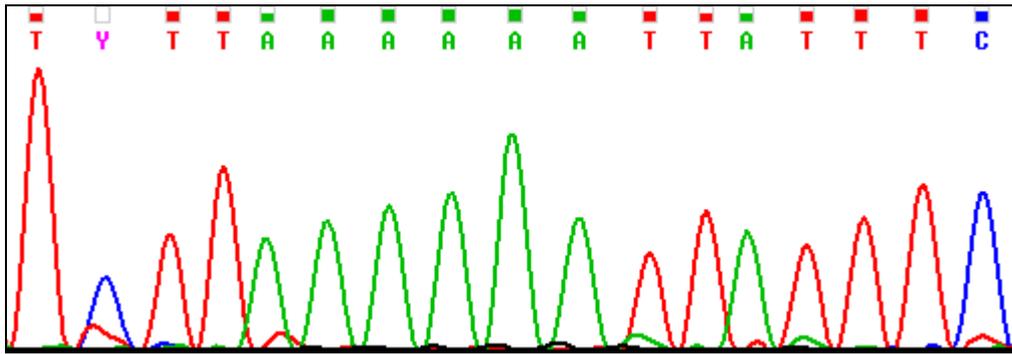
(A)



(B)



(C)



DNS Sequenzierung des Wildtyps (A) eines heterozygoten (B) und eines homozygoten (C) Trägers der Variante. Guanin (schwarz) wird an Stelle c2361 durch Adenin (grün) ersetzt.

Das Kontrollkollektiv wurde mittels enzymatischem Restriktionsverdau auf die Variante untersucht. Das Enzym *Afl II* schneidet nur den Wildtyp, nicht aber die Variante.

Tabelle 5.5

Afl I

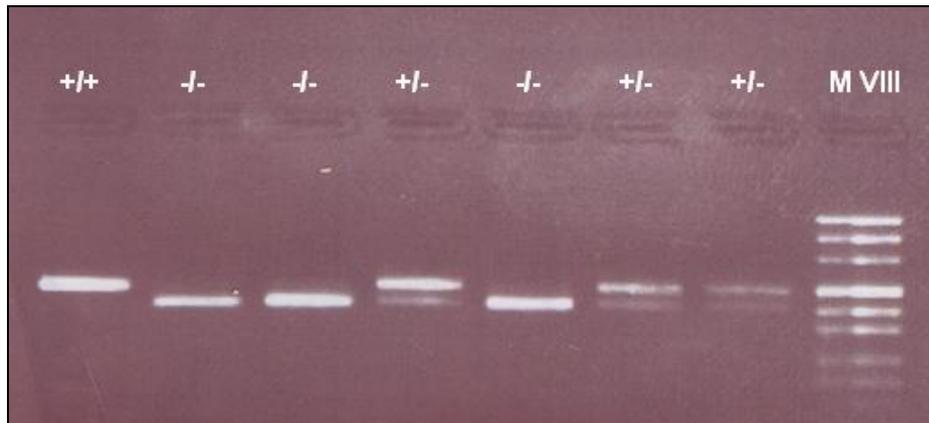
Restriktionsenzym	Quelle	Erkennungssequenz
<i>Afl II</i>	E. Coli Stamm mit geklontem <i>Afl II</i> - Gen aus <i>Anabaena flos-aquae</i>	5'..C TTAAG...3' 3'..GAATT C..5'

Das Restriktionsenzym *Afl II* schneidet nur den Wildtyp (AGA) nicht die Variante (AAA).

Wie die Abbildung 5.11. verdeutlicht können auch homozygote Träger nach der Gelelektrophorese vom Wildtyp abgegrenzt werden

Abbildung 5.11

RFLP-Analyse der Variante R773K



Gelelektrophorese nach analytischem Restriktionsverdau des Fragments Exon 14.

Die Abbildung zeigt neben Wildtypen (-/-) und heterozygoten (+/-) auch einen homozygoten (+/+) Träger der Variante. Afl2 schneidet nur die Allele des Wildtyps.

In den 180 Kontrollen wurden mit 86 Träger der R773K Variante identifiziert; davon waren 16 homozygot. Die Variante ist bereits beschrieben (rs2278792) und liegt im Hardy-Weinberg- Gleichgewicht. Von weiteren Untersuchungen dieser Variante wurde aufgrund des häufigen Auftretens, auch bei gesunden Probanden, abgesehen.

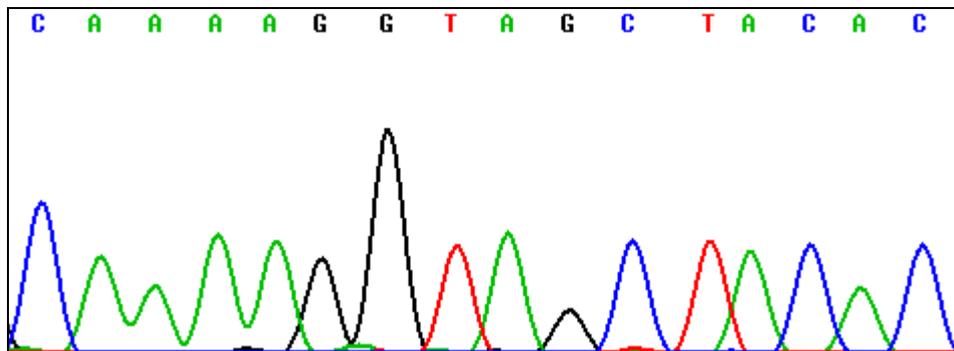
5.2.2.6 Die Variante DSG2-V920G

Schließlich konnte noch eine kodierende Variante in Exon 15 nachgewiesen werden. An Stelle c.2802 wird Thymin durch Guanin ausgetauscht. Das von GTA zu GGA veränderte Basentriplett kodiert statt für Valin an Position 920 für Glyzin (V920G). Die Variante konnte in zwei Individuen des fDCM Kollektivs nachgewiesen werden. Beide waren heterozygot.

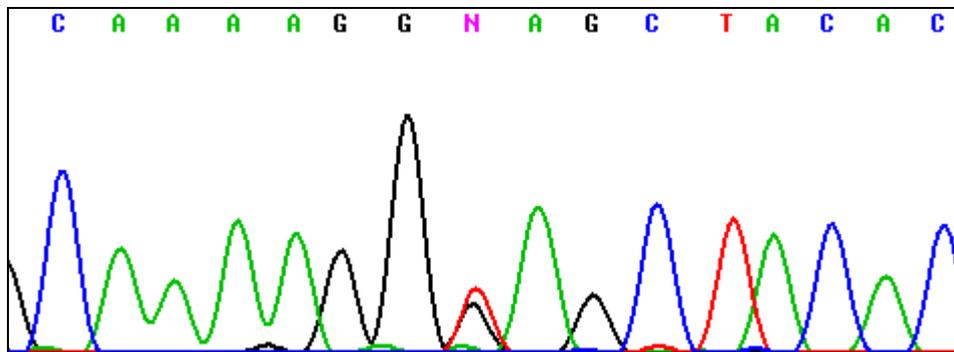
Abbildung 5.12

DNS-Sequenzierung der Variante c.2802 T>G

(A)



(B)

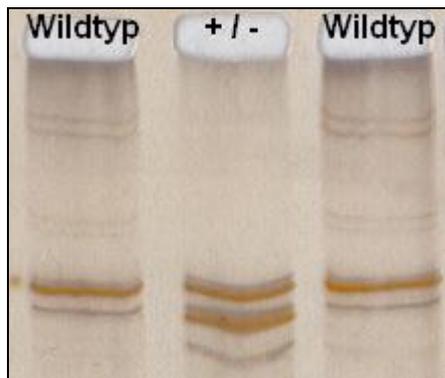


DNS Sequenzierung des Wildtyps (A) und eines heterozygoten Trägers der Variante (B). Thymin (rot) wird durch Guanin (schwarz) ersetzt.

Die Untersuchung des Kontrollkollektivs wurde mittels SSCP durchgeführt, da kein entsprechendes Restriktionsenzym identifiziert werden konnte. Zugunsten einer verbesserten Differenzierung von Wildtyp und Variante in der SSCP wurde für die Variante ein neues Fragment 15b² generiert. Hierzu wurde ein neues Primerpaar (Tabelle 4.2) ermittelt und das entsprechende Fragment mit der DNS der Variantenträger bzw. entsprechender Kontroll-DNS neu mittels PCR amplifiziert. Die Variante lässt sich nach Auftrennung bei 10°C in dem PAA-Gel (12%) klar von der negativen Kontrolle abgrenzen. Abbildung 5.13. zeigt beispielhaft einen Ausschnitt des mittels Silberfärbung gefärbten PAA-Gels.

Abbildung 5.13

SSCP-Analyse der Variante V920G



SSCP-Gel (PAA 12%, 10°C) nach abgeschlossener Silberfärbung. Die DNS mit der Variante lässt sich vom Wildtyp klar abgrenzen.

Die Veränderung konnte in keinem Allel der Kontrollen nachgewiesen werden und wurde daher als potentiell pathogen eingestuft. Weitere Untersuchungen der Variante V920G sind in Kapitel 5.3 beschrieben.

Tabelle 5.6**Detektierte Varianten in dem fDCM Kollektiv**SNP ID entsprechen <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/SNP>

Exon/Intron	Nukleotidposition und –substitution	Aminosäuren- austausch	Häufigkeit in fDCM n=73	SNP ID
Kodierende Varianten				
Exon 3	c.209 G>A	V56M	1 (A/A)	neu
Exon 5	c.516 T>G	V158G	3 (T/G)	neu
Exon 8	c.920 A>G	I293V	10 (A/G)	rs2230234
Exon 14	c.2180 G>A	E713K	12 (G/A)	neu
	c.2361 G>A	R773K	23 (G/A) 9 (A/A)	rs2278792
Exon 15	c.2802 T>G	V920G	2 (T/G)	Neu
Nicht-kodierende Varianten				
Exon 8	c.904 C>T	N287N	32 (C/T) 10 (T/T)	rs2230233
Exon 15	c.2548 G>A	T835T	11 (G/A)	rs1042769
	c.3364 T>C	V1108V	31 (T/C) 7 (C/C)	rs1791235
Intronische Varianten				
5'UTR	c.-36 C>G		1 (G/C)	Neu
5'UTR	c.-51 G>C		2 (C/G)	Neu
Intron 2	c.124+86 G>A		34 (G/A) 6 (A/A)	rs2276149
Intron 7	c.871+16 C<A		27 (C/A) 10 (A/A)	rs3737378
Intron 8	c.1057+28 G<A		27 (G/A) 7 (A/A)	Neu
Intron 11	c.1022+70 G>A		11 (T/C)	rs2276150

Die Allelfrequenz sämtlicher kodierender Varianten im fDCM-Kollektiv wurde mit der Allelfrequenz in 180 Kontrollen verglichen. Bis auf die Varianten V56M und V920G wurden sämtliche Varianten auch in Kontrollprobanden ohne Kardiomyopathie nachgewiesen (Tabelle 5.7).

Die statistische Auswertung der Allelhäufigkeiten zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen dem fDCM-Kollektiv und dem Kontrollkollektiv im Falle von V158G, I293V, E713K und R773K.

Tabelle 5.7

Verteilung der kodierenden SNPs in den Allelen fDCM Kollektiv bzw. den Kontrollen

Variante	Beobachtete Häufigkeit fDCM (n=73)	Beobachtete Häufigkeit Kontrollen (n=180)	Verteilung signifikant (p-Wert)
V158G	G/G 70 T/G 3 T/T 0	G/G 176 T/G 4 T/T 0	Nein (0,68)
I293V	A/A 63 A/G 10 G/G 0	A/A 160 A/G 20 G/G 0	Nein (0,58)
E713K	G/G 61 G/A 12 A/A 0	G/G 155 G/A 25 A/A 0	Nein (0,62)
R773K	G/G 41 A/G 23 A/A 9	G/G 93 A/G 71 A/A 16	Nein (0,9)

Der p-Wert wurde mittels χ^2 ohne Yates Korrektur und bei Fallzahlen <5 mit dem zweiseitigen exakten Test nach Fisher berechnet.

5.3 Weiterführende Untersuchung der Varianten V56M und V920G

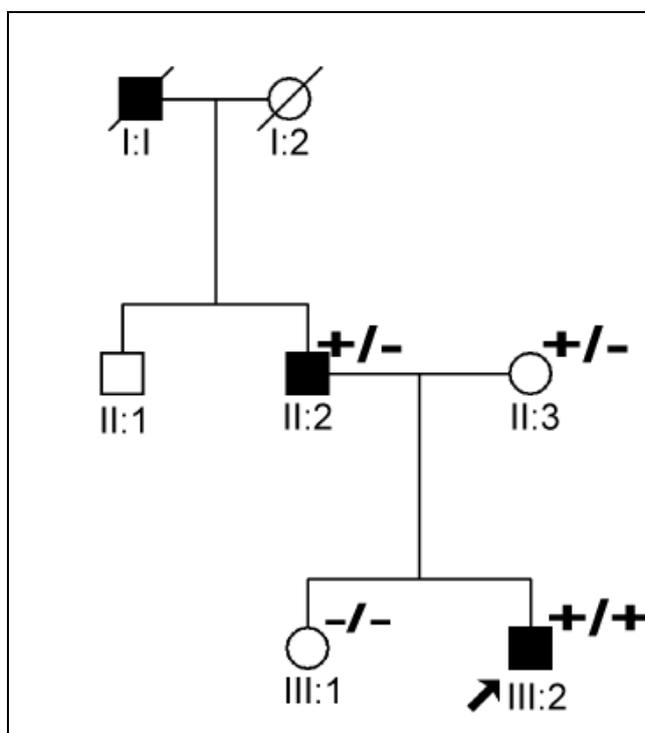
Die beiden kodierenden Varianten V56M und V920G konnten in dem Kontrollkollektiv nicht nachgewiesen werden. Für diese wurden daher weitere Analysen innerhalb der jeweiligen Familien durchgeführt, die in den folgenden Kapiteln beschrieben werden.

5.3.1 V56M – die Familie des Indexpatienten (4370)

Die Variante V56M wurde in einem Patienten des fDCM Kollektives identifiziert. Bei dem Träger handelt es sich um einen männlichen Patienten, bei dem im Alter von 41 Jahren eine schwere DCM diagnostiziert wurde. Echokardiographisch wurde der LVEDD mit 76 mm (144%) gemessen. Die linksventrikuläre Ejektionsfraktion LVEF betrug lediglich 19%. Das zu dieser Zeit angefertigte EKG zeigt einen kompletten Linksschenkelblock sowie einen AV-Block ersten Grades. Aufgrund seiner schweren DCM wurde dem Patient im Alter von 43 Jahren ein linksventrikuläres Herzunterstützungssystem (Berlin Heart Incor) implantiert. Im Alter von 44 Jahren erfolgte schließlich eine orthotope Herztransplantation im Deutschen Herzzentrum Berlin. Die Angehörigen des Index-Patienten wurden untersucht und ein Stammbaum (D4370) erstellt. Die DNS der Familienangehörigen wurde soweit verfügbar auf die Variante V56M untersucht. Der Stammbaum und die entsprechenden Genotypen der Familienangehörigen sind in Abbildung 5.14. dargestellt.

Abbildung 5.14

Stammbaum des Indexpatienten 4370



○ = weiblich, □ = männlich, ■ bzw. ● = betroffen, +/- = heterozygoter Träger der Variante, -/- = Wildtyp, +/+ = homozygoter Träger der Variante, Ø = verstorben, Pfeil: Indexpatient.

Der Vater ist heterozygot für die V56G-Variante und ebenfalls an einer DCM erkrankt. Er weist jedoch im Vergleich zu seinem homozygoten Sohn eine mildere Ausprägung der Erkrankung auf. Bei ihm wurde im Alter von 75 Jahren echokardiographisch ein LVEDD von 71 mm bei einer LVEF von 41% gemessen. Die Schwester des Indexpatienten war negativ für die Variante und nicht an einer DCM erkrankt. Die Mutter des Indexpatienten stand weder für eine kardiologische noch genetische Untersuchung zur Verfügung. Die genetischen Ergebnisse des Sohnes (homozygot) zeigen, dass die Mutter ebenso wie der Vater heterozygot für die V56M Variante sein müssen. Die Mutter des Patienten war anamnestisch herzgesund und zeigte keine Symptome einer Herzinsuffizienz.

Die Tatsache, dass die Mutter klinisch gesund ist, jedoch heterozygote Trägerin einer möglicherweise pathogenen Genmutation, legt eine inkomplette Penetranz nahe. Die Variante V56M zeigt innerhalb dieser Familie eine positive Segregation.

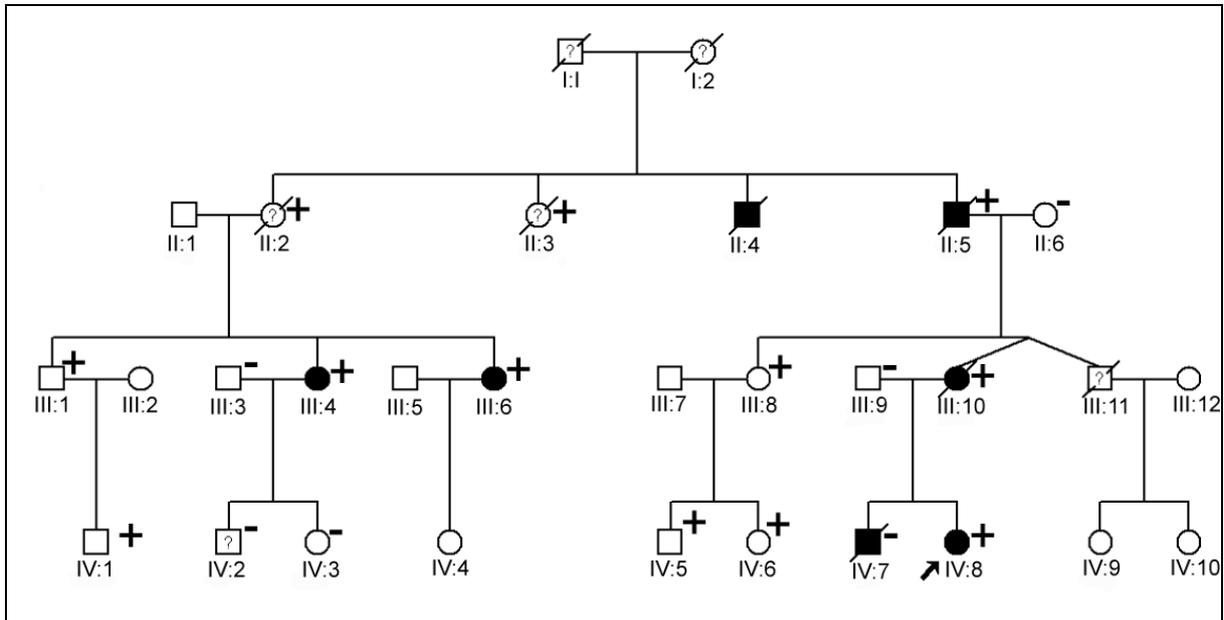
5.3.2 V920G – die Familien der Indexpatienten (3454) und (4514)

Die Variante V920G wurde in zwei unverwandten Patienten des fDCM Kollektives identifiziert. Die Angehörigen des Indexpatienten 3454 stimmten einer klinischen sowie genetischen Charakterisierung zu. In dieser Familie konnten insgesamt 17 Angehörige klinisch und genetisch untersucht werden. (Abb. 5.15 A). Der Stammbaum erfasst weitere 9 Familienangehörige, die zum Teil echokardiographisch untersucht oder fremdanamnestisch charakterisiert werden konnten. Insgesamt waren fünf Familienmitglieder von einer fDCM betroffen. 17 Angehörigen wurden auf die V920G Variante genotypisiert.

Abbildung 5.15

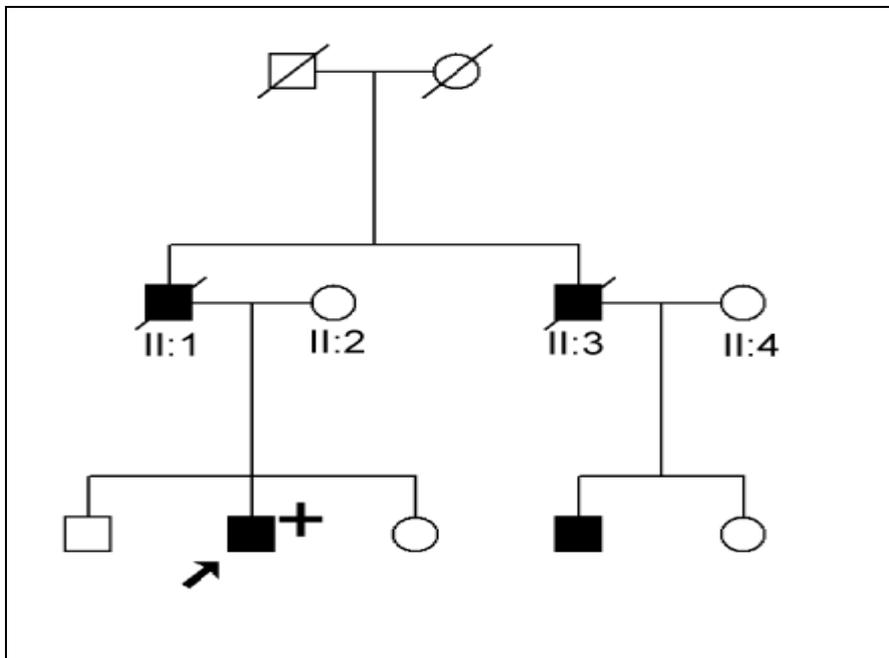
Stammbäume der Indexpatienten 3454(A) und 4514(B)

(A)



○ = weiblich, □ = männlich, ■ bzw. ● = betroffen, + = heterozygoter Träger der Variante, - = Wildtyp, Ø = verstorben, Pfeil: Indexpatient.

(B)



○ = weiblich, □ = männlich, ■ bzw. ● = betroffen, + = heterozygoter Träger der Variante, Ø = verstorben, Pfeil: Indexpatient.

Bei näherer Betrachtung des Stammbaums D3454 (A) fällt auf, dass die genetische Variante V920G nicht mit dem Auftreten einer DCM korreliert. Insgesamt sechs Träger der Variante (III:1, III:8, IV:1, IV:4, IV:5 und IV:6) zeigten echokardiographisch eine normale Herzfunktion und normale ventrikuläre Durchmesser. Darüberhinaus war der im Alter von 18 Jahren verstorbene Patient IV:7 negativ für die V920G-Variante, aber von einer schweren DCM betroffen. Er wurde bereits im Alter von 18 Jahren herztransplantiert und verstarb postoperativ an einer akuten Organabstoßung. Die fehlende Segregation der V920G Variante mit der Erkrankung innerhalb dieser großen Familie spricht gegen einen kausalen Zusammenhang. Die zu Grunde liegende Genmutation bei dieser Familie ist nicht die Variante V920G.

Die Familienangehörigen des Indexpatienten 4514 standen für eine genetische Analyse nicht zur Verfügung, sodass die Segregation der V920G Variante mit der Erkrankung nicht untersucht werden konnte.

Die Familienuntersuchung der beiden kodierenden Varianten war also im Falle der V56G-Variante mit einer Pathogenität für fDCM vereinbar (autosomal dominanter Erbgang mit inkompletter Penetranz). Im Falle der V920G-Variante ist die Segregation innerhalb des Stammbaums D3454 nicht mit einer Pathogenität vereinbar.

In den folgenden Untersuchungen sollte nun geklärt werden, ob die V56G-Variante eine krankheitsspezifische familiäre Mutation ist oder möglicherweise ein häufigeres Phänomen bei Patienten mit DCM ist. Aus diesem Grund wurden zusätzlich zu den 180 Kontrollprobanden weitere Kontrollkollektive (n= 437) sowie ein großes Kollektiv von Patienten mit iDCM (n=538) auf die V56M Variante untersucht.

5.4 Untersuchungen zur Klärung der Pathogenität der Variante V56M

Die betroffene Aminosäure Valin ist über verschiedenen Säugetierarten konserviert, was für eine funktionelle Bedeutung spricht.

Abbildung 5.16

Konservierung der Aminosäure Valin an Position 56 über verschiedenen Säugetierarten (nach www.ensembl.org)

Variante:	QKRAWITAPMALREGEDLSR
Homo sapiens:	QKRAWITAPVALREGEDLSR
Mus musculus:	QKRAWITAPVALREGEDLSR
Bos taurus:	QKRAWITAPVALREGEDLSR
Rattus norvegicus:	QKRAWITAPVALREGEDLSK
Canis familiaris:	QKRAWITAPVALREGEDLSK

5.4.2 Assoziationsstudie

Im Zuge der Assoziationsstudie wurden insgesamt 1228 Individuen mittels RFLP genotypisiert.

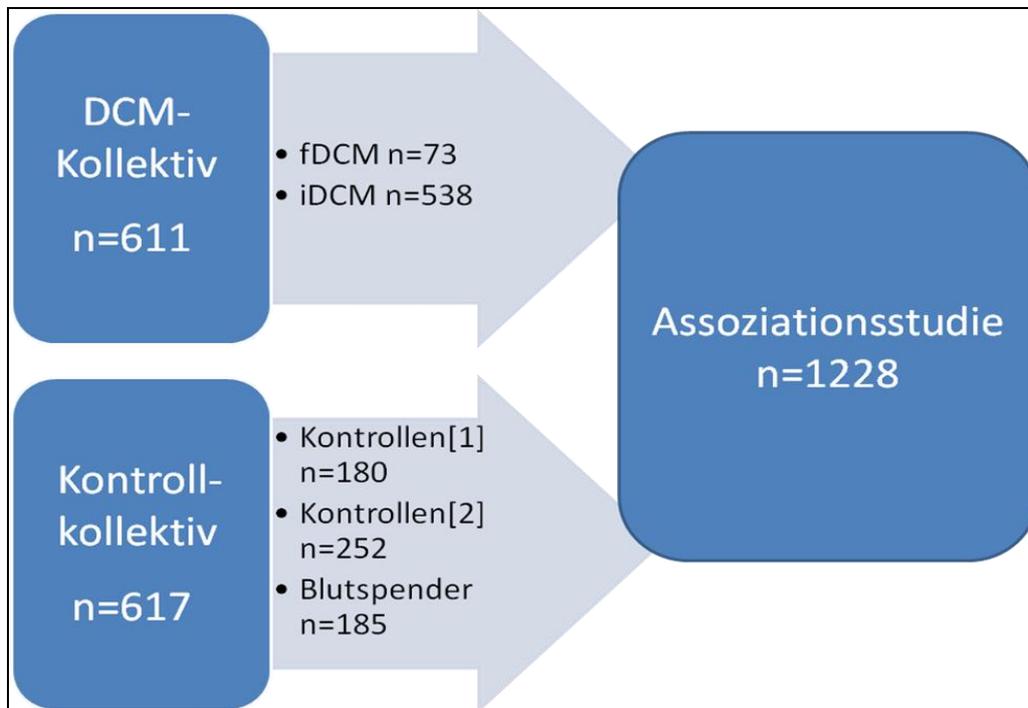
Das Kontrollkollektiv bestand aus 617 herzgesunden Probanden. Zu den 180 bereits im Vorfeld untersuchten Kontrollprobanden kamen weitere 252 Kontrollprobanden eines äquivalenten Kollektivs. Außerdem wurden weitere 185 anonyme Blutspender für das Kontrollkollektiv genotypisiert.

Das DCM-Kollektiv bestand aus 611 unverwandten Patienten mit gesicherter DCM.

Neben den bereits untersuchten 73 Indexpatienten mit fDCM wurden 538 Patienten mit iDCM genotypisiert. Alle Individuen des DCM-Kollektivs erfüllten die DCM-Diagnosekriterien der American Heart Association³.

Abbildung 5.17

Zusammensetzung der Kollektive der Assoziationsstudie



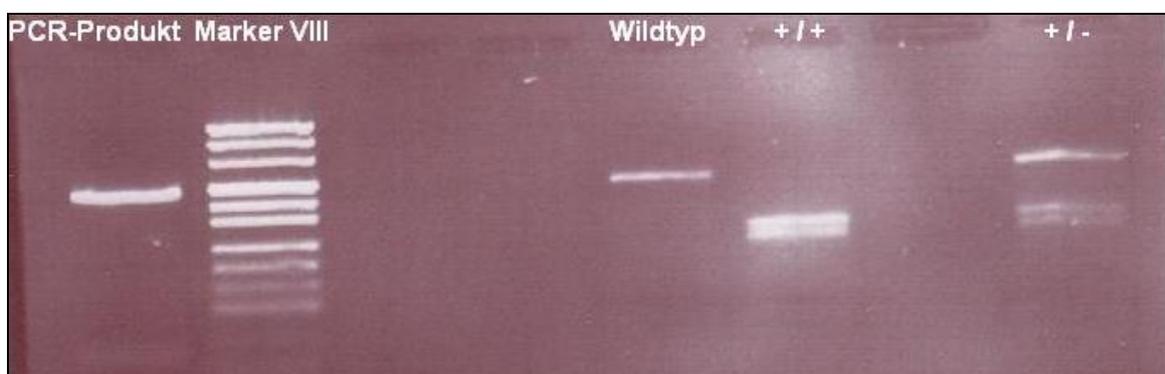
Assoziationsstudie der Variante V56M mit iDCM in einem Kollektiv von insgesamt 1228 Individuen.

Die Kollektive wurden analog zu der vorangegangenen Untersuchung mittels RFLP auf die Variante untersucht. Das Enzym Nco I ließ eine Unterscheidung zwischen Wildtyp, homozygotem (Index) und heterozygoten (Vater des Index) Träger der Variante zu. Jede positive Probe wurde zusätzlich sequenziert, um das Ergebnis zu bestätigen.

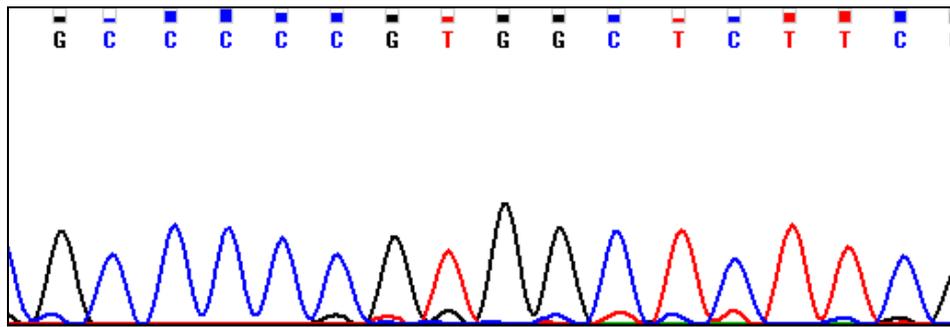
Abbildung 5.18

DNS-Sequenzierung und RFLP-Analyse identifizierter Träger der Variante V56M

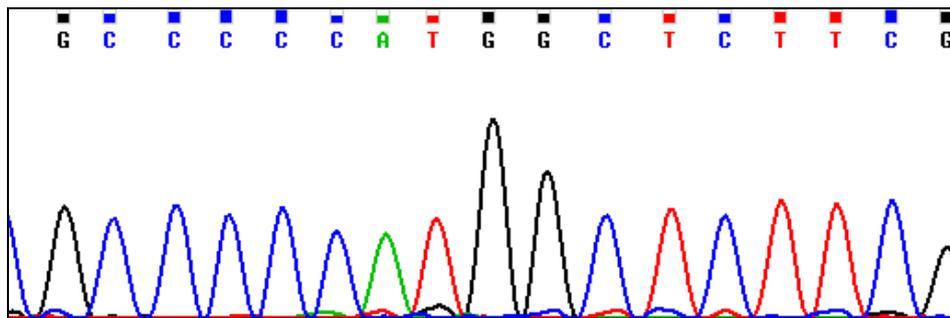
(A)



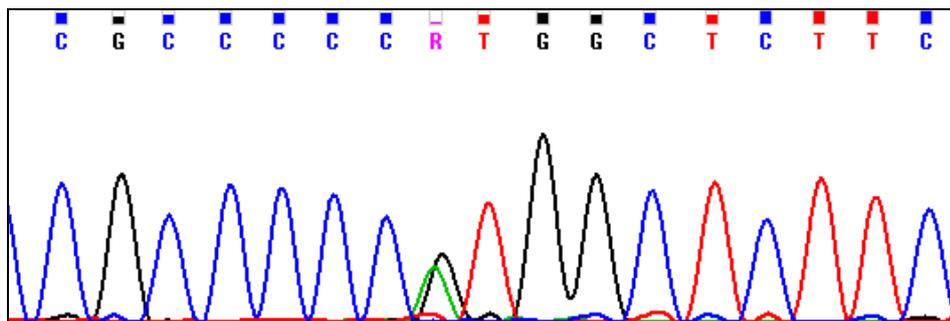
(B)



(C)



(D)



Gelelektrophorese nach analytischem Restriktionsverdau ++ =homozygoter Träger, +/- = heterozygoter Träger (A).

Neben dem Wildtyp können auch heterozygote von homozygoten Variantenträger durch Restriktionsverdau mit *Nco I* unterschieden werden.

Die entsprechenden DNS-Sequenzierungen des Wildtyps (B) und der homo- (C) bzw. heterozygoten (D) Variante.

Von den 538 Patienten mit iDCM waren 13 (2,41%) heterozygote Träger der Variante. Unter den 432 kardial gesunden Patienten fand sich hingegen nur ein einziger (0,23%) heterozygoter Träger der Variante ($p < 0,005$). Unter den 185 anonymen Blutspendern konnte die Variante nur in zwei Patientenproben (1,1%) in der heterozygoten Form nachgewiesen werden ($p < 0,38$). Die Häufigkeit der Variante ist im iDCM-Kollektiv

entsprechend zehnmal so hoch im Vergleich zu dem Kontrollkollektiv aus kardial gesunden Individuen bzw. doppelt so hoch im Vergleich mit den Individuen aus dem Kollektiv mit unbekanntem kardialen Phänotyp.

In der Studie mit 1.228 Individuen konnte eine signifikante Assoziation ($p < 0,00691$) der Variante V56M mit dem Auftreten einer DCM nachgewiesen werden.

Tabelle 5.8

Ergebnis der Assoziationsstudie im zweiseitigen exakten Test nach Fisher

	V56M Variante	Wildtyp	Summe
DCM-Kollektiv	14	597	611
Kontrollkollektiv	3	614	617
Summe	17	1.211	1.228

Die Variante V56M ist signifikant mit dem Auftreten einer iDCM assoziiert ($p = 0,0069$).

Aufgrund der Anonymität der Blutspender kann über deren kardialen Phänotyp keine Aussage getroffen werden, was den Nutzen dieser Kontrollen einschränkt. Auch unter Ausschluss der 185 anonymen Blutspender zeigt sich eine signifikante Assoziation der Variante mit iDCM. Das Ergebnis zeigt in diesem Fall sogar eine noch höhere Signifikanz.

Tabelle 5.9

Ergebnis der Assoziationsstudie im zweiseitigen exakten Test nach Fisher unter Ausschluss der Kontrollen mit unbekanntem kardialen Phänotyp (Blutspender n=180)

	V56M Variante	Wildtyp	Summe
DCM-Kollektiv	14	597	611
Kontrollkollektiv	1	431	432
Summe	15	1028	1043

Die Signifikanz des Ergebnisses wird durch den Ausschluss der anonymen Kontrollen gesteigert ($p = 0,0062$).

5.4.3 Genotyp-Phänotyp Studie

Die in der Assoziationsstudie erzielten Ergebnisse legen nahe, dass es sich bei der V56M Variante um eine Risikovariante für DCM handelt. Um weiterhin zu untersuchen,

ob die Variante auch einen modifizierenden Einfluss auf den klinischen Phänotyp im Sinne einer *Modifier* Variante *hat* , wurden klinische Parameter sämtlicher DCM Patienten ohne die Variante mit den klinischen Parametern der Variantenträger mit Hilfe des Student T-Test verglichen.

Tabelle 5.10

Genotyp-Phänotyp Studie

	DSG2 Wildtyp	DSG2 Variante V56M	Signifikanz
Alter	55,8 (±12)	52,6 (±15)	Nein
Geschlecht	63/285	1/13	Nein
LVEDD[mm]	144,2(±28)	135,8(±11)	Nein
FS[%]	18,6(±8)	16,7(±6)	Nein
EF[%]	33,4(±10)	36,2(±14)	Nein
Vorhofflimmern	89	7	Nein

Vergleich klinischer Merkmale zwischen erkrankten Variantenträgern. Und erkrankten Wildtypen.

Es konnte kein signifikanter Unterschied bezüglich der gewählten Parameter Geschlecht, Alter, ventrikulärer Durchmesser, Kontraktilität oder Arrhythmie zwischen den Gruppen nachgewiesen werden. Die Variante stellt in dem untersuchten Kollektiv keine *Modifier*-Variante für die DCM dar.

6 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden 73 Patienten mit fDCM auf genetische Varianten im DSG2 Gen untersucht. Es konnten insgesamt 15 genetische Varianten identifiziert werden. Darunter waren sechs kodierende Varianten, von denen vier zum Zeitpunkt der Analyse nicht bekannt waren. Die V56M-Variante zeigte eine positive Segregation in der Familie des Indexpatienten. Weiterhin konnte mit Hilfe einer großen Assoziationsstudie eine signifikant höhere Prävalenz bei Patienten mit idiopathischer DCM im Vergleich zu Kontrollprobanden ohne DCM nachgewiesen werden. Es zeigten sich allerdings keine Unterschiede der klinischen Parameter zwischen DCM Patienten mit der bzw. ohne die V56M Variante.

6.1 Bewertung der Methodik

Eine genetische Diagnostik bei der DCM, deren Ätiologie durch viele verschiedene Faktoren beeinflusst wird, stellt eine besondere Herausforderung dar. Genetische, erworbene und umweltbedingte Faktoren beeinflussen sich positiv wie negativ untereinander und machen eine Zuordnung der Krankheitsursache in vielen Fällen schwierig.

Die genetische Untersuchung von familiären Formen der DCM erhöht die Wahrscheinlichkeit der Detektion krankheitsverursachender Genvarianten. Außerdem kann anhand des Stammbaums der Indexpatienten die Segregation der Genvarianten mit der Erkrankung überprüft werden. Im Falle eines negativen Ergebnisses – d.h. wenn keine DCM assoziierten Varianten gefunden werden – kann das entsprechende Gen mit hoher Wahrscheinlichkeit als relevantes Krankheitsgen für die entsprechende Familie ausgeschlossen werden. Für die gegenwärtige Studie wurde ein Kollektiv aus 73 unverwandten Patienten gewählt, welche die Diagnosekriterien für eine fDCM⁵ erfüllten. Einige Krankheitsgene waren in vorangegangenen bzw. parallel durchgeführten Untersuchungen bei 69 Patienten als Ursache ausgeschlossen worden. Dazu zählten Lamin A/C (LMNA)⁶², Calsarcin-1 (MYOZ1), Calsarcin-2 (MYOZ2)⁶³, Telethonin (TCAP) und Phospholamban (PLN). Das Kontrollkollektiv setzte sich aus 180 Individuen ohne echokardiographische Zeichen einer DCM zusammen.

Bezüglich genetischer Mutationsanalysen stehen zahlreiche Methoden wie z.B. SSCP, RFLP, DGGE (denaturierende Gradientenelektrophorese), TTGE (Temporal temperature gradient electrophoresis), oder auch HA (Heteroduplexanalyse), zur

Verfügung⁵⁹. In der vorliegenden Arbeit wurde die sensitivste Methode, die automatische, direkte Sequenzierung der DNS, gewählt. Die Präzision der direkten Sequenzierung mit dem genetischen Analysegerät ABI-3100 beträgt im Bereich von 27 bis 576 bp ca. 99,91% (SA 0,33%)⁶⁴. Vier Fragmente (Fragment 13, 14, 15b und 15c) konnten nach Auswertung der Sequenzierung unter Verwendung des Vorwärtsprimer im Cycle Sequencing bis zum Ende des kodierenden Abschnitts nicht sicher beurteilt werden. Aus diesem Grund wurde in diesen vier Fällen eine zusätzliche Rückwärtssequenzierung durchgeführt. Alle Bereiche konnten auf diese Weise auch bei diesen Fragmenten sicher und mit hoher Sensitivität beurteilt und ausgewertet werden. Sämtliche kodierenden DSG2-Varianten wurden zusätzlich entweder mittels analytischem Restriktionsverdau oder mittels SSCP bestätigt und in Kontrollprobanden untersucht.

Im Zuge der Assoziationsstudie wurden insgesamt 1.228 Individuen mittels enzymatischem Restriktionsverdau auf die Variante V56M untersucht. Jede positive Probe wurde zur Bestätigung zusätzlich sequenziert.

6.2 Ergebnisse der genetische Analyse

Ziel der Arbeit war die Identifikation genetischer Varianten im DSG2 Gen. Es konnte eine hohe Anzahl neuer Varianten im DSG2 Gen identifiziert werden. Unter den insgesamt 15 Varianten waren sechs kodierende, von denen wiederum vier zum Zeitpunkt der Analyse nicht bekannt waren. Im Vergleich fanden sich in einer parallel durchgeführten Analyse im Desmocollin-2 Gen (DSC2) lediglich drei kodierende Varianten⁶⁵. Die Angaben über genetische Varianten in den Online-Datenbanken (Ensembl, NCBI, GeneCards etc) beruhen vor allem auf Ergebnissen großer genetischer Populationsstudien (Human Genome Project, HapMap etc.) in welchen bislang eine verhältnismäßig geringe Anzahl von Individuen (HapMap z.B.: n= 60) eingeschlossen wurde. In den bereits publizierten Mutationsanalysen im DSG2- Gen in Patienten mit ARVC/D waren lediglich Mutationen beschrieben, welche in Kontrollprobanden ausgeschlossen wurden und als potentiell pathogen anzusehen sind^{45,47,49}. Die übrigen kodierenden und nicht kodierenden Varianten wurden nicht beschrieben. Anhand der relativ hohen Prävalenz einiger nicht-synonymer Varianten (V158G und E713K) muss davon ausgegangen werden, dass auch im Zuge dieser Untersuchungen einige dieser Varianten detektiert jedoch nicht publiziert wurden.

In der Literatur finden sich für potentiell pathogene genetische Varianten unterschiedliche Bezeichnungen. Häufig wird zwischen genetischen Polymorphismen und Mutationen unterschieden. Die Definition dieser Begriffe erweist sich jedoch in verschiedenen Arbeiten als äußerst uneinheitlich und wurde in der Vergangenheit immer wieder diskutiert⁶⁶⁻⁶⁸. In der vorliegenden Arbeit wurde überwiegend der neutralste Begriff der genetischen Variante verwendet und deren Bedeutung anhand der Ergebnisse objektiv eingeschätzt.

6.2.1 Varianten in intronischen Abschnitten bzw. der untranslatierten Region

Das vorrangige Ziel der Arbeit war die Identifizierung kodierender Genvarianten, da Änderungen der Aminosäuresequenz des Proteins am ehesten einem pathogenen Effekt zuzuordnen sind. Allerdings konnte gezeigt werden, dass auch Varianten, welche außerhalb der Exons liegen, unter Umständen Einfluss auf das entsprechende Proteinprodukt haben. Intronische Varianten, welche am Intron/Exon Übergang liegen, können Erkennungssequenzen zerstören und so zu einer Störung des Spleißvorgangs bzw. zu aberrantem Spleißen der RNS führen⁶⁹. Heuser et al. konnten zeigen, dass eine intronische Variante im DSC2 bei einem Patienten mit ARVC/D zu einem alternativen Spleißprodukt führt⁴⁶. Das entsprechend fehlkodierte Protein führt im Zebrafischmodell zu einem kardialen Ödem. Auch wenn die Autoren keine weiteren betroffenen Familienangehörigen des Indexpatienten genetisch oder klinisch untersucht ist anzunehmen, dass die entsprechende Genmutation (c.631-2 A>G) pathogen für die ARVC/D ist. Verglichen mit Mutationen, welche im kodierenden Bereich der DNS liegen, sind intronische Mutationen, die das RNS-Processing betreffen, wahrscheinlich relativ selten⁶⁹. Hierbei muss allerdings beachtet werden, dass intronische Varianten häufig nicht weiter untersucht wurden und ihre Bedeutung derzeit somit möglicherweise unterschätzt wird. Außerdem werden meistens, wie auch in der vorliegenden Untersuchung, nur intronischen Bereiche analysiert, welche in unmittelbarer Nachbarschaft zu den kodierenden Exons liegen. Dieser Bereich stellt nur einen Bruchteil des gesamten intronischen Bereichs dar. Insgesamt konnten vier Varianten in den flankierenden intronischen Bereichen des DSG2 Gens identifiziert werden. Diese liegen jedoch nicht in direkter Nähe (<16bp) des Intron/Exon-Übergangs, wie beispielsweise die DSC2 Mutation aus der Arbeit von Heuser et al. Alle intronischen DSG2-Varianten konnten in dem fDCM-Kollektiv in über zehn Patienten nachgewiesen werden und sind zudem in den Datenbanken bereits

gelistet. Aufgrund dieser Ergebnisse scheint die Bedeutung dieser Varianten hinsichtlich der fDCM gering. Es wurden daher keine weitergehenden funktionellen Untersuchungen für die Varianten durchgeführt.

Zwei weitere Varianten liegen im 5'UTR Bereich des DSG2 Gens. Es handelt sich dabei um den untranslatierten Bereich vor Exon 1. Dieser Bereich eines Gens kann hundert oder mehr Nukleotide umfassen. Die Sequenz wird auch als *Leadersequenz* bezeichnet und kann verschiedene regulatorische Sequenzen enthalten ⁷⁰. Die Varianten konnten in dem Kollektiv bei jeweils einem Patienten nachgewiesen werden und sind bisher nicht beschrieben. Eine Bedeutung dieser Varianten in der Pathogenese der fDCM scheint nicht ausgeschlossen, wurde jedoch im Zuge dieser Arbeit nicht untersucht.

6.2.2 Synonyme Varianten

Insgesamt konnten drei synonyme exonische Varianten im DSG2 Gen identifiziert werden (N287N, T835T, V1106V). Diese führen definitionsgemäß nicht zu einer Änderung der Aminosäuresequenz. Die veränderten Nukleotide liegen an dritter Position innerhalb des betroffenen Basentriplets. Zwar bleibt die Primärstruktur (Aminosäurefolge) des DSG2 Proteins von solchen synonymen Varianten unverändert, dennoch konnte gezeigt werden, dass synonyme Varianten einen pathogenen Effekt haben können. Awad et al. fanden eine synonyme Variante im Plakophilin-2 Gen (G828G), die zur Aktivierung einer kryptischen exonischen Spleißregion führt ⁷¹. Die Autoren zeigten, dass die Variante zu einer Verschiebung des Leserasters innerhalb der PKP2 mRNA führt und beschreiben in ihrer Arbeit die kleine Familie eines homozygoten Trägers mit ARVC/D ⁷¹. Auch synonyme Varianten können also eine genetische Ursache für Kardiomyopathien sein. Stumme Varianten sind auch als Ursache anderer Erkrankungen beschrieben und werden dann oftmals als stille Mutationen bzw. *silent mutations* bezeichnet ^{72 73}. Eine pathogenetische Bedeutung synonymen Varianten ist folglich nicht ausgeschlossen. Die Variante N287N in Exon 8, sowie die Varianten T835T und V1106V in Exon 15 konnten in mehr als zehn Fällen in dem fDCM Kollektiv nachgewiesen werden. Alle Varianten waren zum Zeitpunkt der Untersuchung bereits als SNPs unter entsprechender SNP-ID veröffentlicht. Eine Bedeutung dieser Varianten in der Pathogenese der fDCM erscheint wenig wahrscheinlich und wurde nicht weiter untersucht.

6.2.3 Kodierende Varianten

Es konnten insgesamt sechs nicht-synonyme Varianten im DSG2 Gen identifiziert werden (V56M, V158G, I293V, E713K, R773K, V920G). Alle sechs Varianten wurden auf ihre Häufigkeiten in einem Kontrollkollektiv von 180 Patienten ohne Zeichen einer DCM untersucht. Zwei der kodierenden Varianten, I292V und R772K, waren bereits unter den entsprechenden SNP-ID Nummern beschrieben. Diese und auch die Varianten V157G und E712K konnten sowohl im fDCM-Kollektiv als auch in dem Kontrollkollektiv identifiziert werden. Hinsichtlich der Häufigkeiten dieser Varianten in dem fDCM-Kollektiv verglichen mit den Kontrollen ergab sich kein signifikanter Unterschied.

V158G wird in einer Arbeit von Syrris et al. als krankheitsverursachende Mutation in zwei nicht miteinander verwandten Familien mit ARVC/D vorgestellt. Die Variante V158G konnte in drei Patienten des fDCM-Kollektivs und in vier Individuen des Kontrollkollektivs nachgewiesen werden. Keiner der sieben Probanden erfüllte die Diagnosekriterien einer ARVC/D. In Anbetracht dieser Ergebnisse ist es unwahrscheinlich, dass diese Variante Ursache der ARVC/D ist. Die Prävalenz von V158G in den fDCM Patienten wäre für eine Kardiomyopathie-assoziierte Mutation außergewöhnlich hoch (4,1%). In der Arbeit von Syrris et al. sind zwei nichtverwandte V158G-Träger mit einer ARVC/D beschrieben⁴⁷. Es ist bemerkenswert, dass in dieser Arbeit zwar große Familienstammbäume der betroffenen Patienten abgebildet sind, allerdings nur sehr wenige Angehörige klinisch und genetisch untersucht werden konnten. In der hier vorliegenden Untersuchung konnte die V158G-Variante auch in Individuen, die nachweislich weder eine ventrikuläre Dilatation noch eine Hypertrophie bei erhaltener kardialer Funktion haben, nachgewiesen werden. Diese Daten sprechen dagegen, dass DSG2-V158G eine pathogene Variante für Kardiomyopathien ist.

Die Varianten V56M und V920G konnten in den Kontrollekollektiven nicht nachgewiesen werden. Daher wurden diese beiden Varianten auf Ihre Assoziation mit der fDCM innerhalb der Familienstammbäume untersucht.

6.3 Die Variante V920G

Anhand des großen Familienstammbaums des Indexpatienten 3454 wurde eine Segregationsanalyse durchgeführt. Für die genetische Analyse standen 17 Familienmitglieder zur Verfügung. Von diesen waren fünf an einer fDCM erkrankt. Der Bruder der Indexpatientin ist negativ für die Variante jedoch an einer schweren DCM

erkrankt und wurde in diesem Zusammenhang bereits im Alter von 18 Jahren herztransplantiert. Zudem konnten sechs heterozygote Träger der Variante mit normaler Herzfunktion identifiziert werden. Eine Bedeutung der Variante in der Pathogenese der fDCM scheint somit zumindest in dieser Familie eher unwahrscheinlich.

Syrris et al. stellen auch die Variante V920G als krankheitsverursachende Mutation in einer Familie mit ARVC/D vor⁴⁷. Der beschriebene Indexpatient verstarb im Alter von 17 Jahren an plötzlichem Herztod. Post-mortem wurde eine linksventrikuläre Form von ARVC/D festgestellt. Es wird berichtet, dass der Vater zwar einen auffälligen kardialen Phänotyp mit Wandbewegungsstörungen aufweist, jedoch nicht die Diagnosekriterien einer ARVC/D erfüllt. Die Variante war in der Studie von Syrris et al. bei 200 Kontrollindividuen ausgeschlossen worden. Die Variante konnte in der vorliegenden Studie in 432 Kontrollindividuen insgesamt zweimal detektiert werden. Die niedrige Prävalenz der Variante in der Normalbevölkerung erklärt, warum von Syrris et al. die Variante in ihrem Kontrollkollektiv nicht finden konnten. Die V920G Variante ist den gängigen online Datenbanken derzeit zwar noch nicht zu entnehmen, konnte jedoch im Zuge einer Arbeit zur Genetik von Magenkarzinomen in einem gesunden Kollektiv nachgewiesen werden⁷⁴. Vor diesem Hintergrund scheint die direkte krankheitsverursachende Wirkung der Variante zumindest fraglich. Letztendlich kann die genaue Bedeutung der Variante V920G für die Pathogenese von Herzmuskelerkrankungen auch anhand der vorliegenden Daten nicht endgültig geklärt werden und bedarf weiterer Untersuchung.

6.4 Die Variante V56M

Die Variante V56M zeigt eine positive Segregation mit dem Auftreten einer DCM im Stammbaum des Indexpatienten 4370. Der Vater des Indexpatienten ist heterozygot für die Variante und ebenfalls an DCM erkrankt. Der Indexpatient, homozygoter Träger der Variante, zeigt einen früheren Beginn und schwereren Verlauf als sein heterozygoter Vater. Es wäre denkbar, dass die Variante, im Sinne eines Dosis-Wirkungsphänomens, unterschiedlich stark ausgeprägte Formen einer DCM verursacht. Die Schwester ist negativ für die Variante und kardial gesund. Die Tatsache, dass die Mutter des Indexpatienten heterozygot für die Variante ist und ebenfalls gesund ist, ist durch eine inkomplette Penetranz erklärbar. Inkomplette Krankheitspenetranz ist ein bekanntes und häufiges Phänomen bei genetisch bedingten Kardiomyopathien^{4,75}. Nach Erweiterung des Kontrollkollektivs konnte die V56M Variante in den Kontrollindividuen

ohne linksventrikuläre Dilatation und erhaltener LVEF einmal nachgewiesen werden. Zudem waren zwei aus 185 anonymen Blutspendern heterozygote Träger der Variante. Interessanterweise wurde auch V56M von Syrris et al. als familiäre Mutation von ARVC/D beschrieben⁴⁷. In der vorliegenden Untersuchung erfüllte allerdings keiner der 17 Träger der Variante V56M die Diagnosekriterien einer ARVC/D. Die in der Studie von Syrris und Kollegen vorgestellte Indexpatientin ist eine 46jährige Frau mit QRS-Prolongation, T-Wellen Inversion und leicht vergrößertem rechten Ventrikel und erfüllte somit ein Major Kriterium und zwei Minor-Kriterien der ARVC/D⁷⁶. Syrris et al. konnten keine betroffenen Familienangehörigen identifizieren.

Der in der vorliegenden Arbeit identifizierte homozygote Indexpatient zeigte im Alter von 42 Jahren einen LVEDD von 144% und eine LVEF von 19%, elektrokardiografisch einen kompletten Linksschenkelblock und einen AV-Block I°. Klinisch erfüllt er demnach zwei Major-Kriterien (LVEDD, LVEF) und ein Minor (LSB) Kriterium für DCM, gleichzeitig nur ein Minor-Kriterium für ARVC/D (LSB). Er wurde im Alter von 44 Jahren im Deutschen Herzzentrum Berlin herztransplantiert. Der histologische Befund des linken Ventrikels zeigte eine unterschiedlich starke, im Durchschnitt hochgradige muskuläre Hypertrophie mit schweren myokardialen Folgeschäden und Störung der Myokardtextur; ein Bild, welches mit der klinischen Diagnose einer DCM vereinbar ist. Der rechte Ventrikel zeigte eine zelluläre Hypertrophie mit erheblichen myokardialen Folgeschäden im Sinne einer anpassungsbedingten Hypertrophie des Myokards jedoch keine Hinweise auf eine Fibrolipomatose. Der Vater des Indexpatienten zeigte im Alter von 76 Jahren einen LVEDD von 71mm (146%), LVEF von 47% sowie eine absolute Arrhythmie bei Vorhofflimmern und erfüllt damit ein Major (LVEDD) und ein Minor (VHF) Kriterium für fDCM und ein Minor-Kriterium für ARVC/D (VHF)^{5,76}. Der echokardiografische Befund des Vaters zeigt neben dem deutlich dilatierten linken Ventrikel eine mittelgradig eingeschränkte systolische Funktion ohne regionale Kinetikstörungen, sowie beidseitig dilatierte Vorhöfe bei normal großem rechten Ventrikel. Der Indexpatient und sein Vater litten demnach beide definitiv an einer unterschiedlich stark ausgeprägten fDCM. Da jedoch auch gesunde Träger im Kontrollkollektiv gefunden werden konnten, scheint es sich nicht um eine private familiäre genetische Variante zu handeln.

Die Variante beruht auf einem Austausch von Guanin durch Adenin an Stelle c.209. Bei dem vorhergehenden Nukleotid handelt es sich um Cytosin, die Sequenz des Wildtyps liest sich entsprechend als 5'...CGTG...3'. Für den komplementären Strang bedeutet

dies einen Austausch von Cytosin durch Thymin. Es handelt es sich also um eine C zu T- Variante in einem CpG Dinukleotid. CpG-Dinukleotide sind Paarungen, welche aus einer Cytidin-Phosphat-Guanosin Sequenz bestehen. C zu T Mutationen sind aufgrund 5-Methyl Cytosin Desaminierung relativ häufige Mutationen, was diese Regionen zu einem sog. Mutations-Hotspot macht ⁷⁷. Dies ist die Erklärung für das Auftreten der Variante in mehreren unverwandten Individuen.

Für monogenetische Erkrankungen haben sich Untersuchungen von Familienstammbäumen als äußerst effektiv erwiesen. Die familiäre DCM zeigt in einigen Fällen einen solchen monogenen Erbgang: es konnten folglich durch Untersuchungen in betroffenen Familien bereits mehr als 20 Krankheitsgene identifiziert werden. Andere häufige Herzerkrankungen, wie z.B. die koronare Herzkrankheit habe eine multigenetische Ätiologie. In diesen Fällen haben sich Untersuchungen von Familien als weit weniger effektiv erwiesen ⁷⁸. Für die Herzinsuffizienz konnten bereits verschiedene genetische Varianten identifiziert werden, die die Wahrscheinlichkeit des Auftretens einer Erkrankung beeinflussen. ^{79-81 82}. Solche Genvarianten werden als Risikogene, Risikovarianten bzw. Suszeptibilitätsallele bezeichnet. Aus der Tatsache, dass genetische Varianten signifikant häufiger bei erkrankten Personen als bei gesunden Personen vorkommen, schließt man, dass die untersuchte Genvariante für die entsprechende Erkrankung prädisponiert. Auch für die DCM konnten bereits solche genetischen Varianten identifiziert werden ^{83,84}.

In einer Studie von Arimura et al. wurden alle 28 Exons des NEBL Gen, welches für das Sarkomerprotein Nebulette kodiert, in 24 Patienten mit fDCM und 47 Patienten mit iDCM analysiert ⁸⁶. Von insgesamt vier nicht synonymen Varianten zeigte lediglich die N654K Variante eine höhere Prävalenz bei 47 iDCM Patienten im Vergleich zu den 96 Kontrollprobanden. Die Assoziation dieser Variante konnte in weiteren 106 iDCM Patienten und 331 Kontrollprobanden bestätigt werden. Ein höheres Risiko für DCM errechnete sich allerdings nur für die homozygoten N654K Träger ($p=0.002$). Eine ähnliches Bild ergab sich aus der Assoziationsstudie des A16V Polymorphismus im SOD2 Gen. Auch hier waren homozygote Träger unter 34 DCM Patienten im Vergleich zu 380 Kontrollprobanden überrepräsentiert ⁸⁵. Die Autoren dieser Studien diskutierten daher einen *gene-dose* Effekt bei Suszeptibilitätsvarianten für die DCM.

Um festzustellen, ob es sich bei der Variante um eine solche Suszeptibilitätsvariante für DCM handelt, wurde die Assoziationsstudie durchgeführt.

In der vorliegenden Arbeit wurden 1.228 Individuen, davon 611 Patienten mit iDCM und 617 herzgesunde Kontrollindividuen auf die Variante V56M genotypisiert. Die Kontrollprobanden wurden im Rahmen unterschiedlicher Studien rekrutiert und lassen sich in zwei unterschiedliche Kollektive teilen. Zum einen Individuen über 50 Jahre ohne echokardiographischen Nachweis einer ventrikulären Dilatation oder ventrikulären Hypertrophie (n=432), zum anderen anonymisierte Blutspender (n=180).

Das DCM-Kollektiv bestand neben den 73 Patienten mit fDCM aus 538 Patienten mit iDCM. In dem DCM Kollektiv konnten insgesamt 14 heterozygote Träger der V56M Variante identifiziert werden, wohingegen im Kontrollkollektiv nur drei heterozygote Träger gefunden werden konnten. Im Vergleich der Kollektive zeigt die Variante eine signifikante Assoziation mit dem Auftreten einer iDCM ($p < 0,007$).

Aufgrund der Anonymität der Blutspender kann über deren kardialen Phänotyp keine Aussage getroffen werden, was den Nutzen dieser Kontrollen einschränkt. Werden die Blutspender, als Teil des Kontrollkollektivs, von der Untersuchung ausgeschlossen, so steigt die Signifikanz des Ergebnisses weiter an ($p = 0,0058$).

Diese Assoziation lässt den Schluss zu, dass es sich bei der V56M um eine Suszeptibilitätsvariante für DCM handelt.

Im Vergleich zu den bisher identifizierten DCM Suszeptibilitätsgenen ist die Variante DSG2 V56M sehr selten (~1%) und erfordert deshalb die Untersuchung von großen Patienten- und Kontrollkollektiven. Im Gegensatz zu den oben zitierten Studien wurde in der vorliegenden Arbeit nur ein homozygoter Träger identifiziert. Ein *gene-dose* Effekt kann bei dem homozygoten, schwer erkrankten Träger dementsprechend zwar vermutet werden, bleibt aber spekulativ. Offen bleibt auch wie weit in Zukunft zwischen familiärer Mutation und Suszeptibilitätsvarianten unterschieden werden kann. Bei einer idiopathischen DCM fehlen definitionsgemäß weitere betroffene Familienangehörige⁵. 13 Patienten des untersuchten iDCM Kollektivs sind Träger des veränderten Allels. Sieht man von der Möglichkeit von Spontanmutationen ab, so müssen mindestens 50 Prozent der jeweiligen Angehörigen gesunde Träger des Allels sein.

Repetto et al. konnten durch ein *Rescreening* von Familienangehörigen von 73 Patienten mit iDCM eine signifikante Erhöhung der Anzahl betroffener Angehöriger zeigen. Vier Fälle von iDCM mussten in Folge der Familienuntersuchung als fDCM klassifiziert werden⁸⁶. Möglicherweise wären auch in dem in dieser Arbeit untersuchten iDCM Kollektiv einige Fälle von bisher unbekannter fDCM durch ein Rescreening erfassbar.

Einige genetische Varianten beeinflussen einzelne Merkmale (Phänotypen) oder den Verlauf bestimmter Erkrankungen. Derartige *disease-modifier* konnten in der Vergangenheit für verschiedene Kardiomyopathien identifiziert werden⁸⁷⁻⁸⁹. Ein Vergleich der klinischen Phänotypen zwischen V56M positiven und negativen iDCM Patienten ergab allerdings keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich Alter, Geschlecht, LVEDD, FS oder der Prävalenz von Vorhofflimmern. Für eine genauere Beurteilung der Bedeutung der Variante wären allerdings, aufgrund der Heterogenität der Erkrankung und der großen Zahl an beeinflussenden Umweltfaktoren, weitere spezifischere Untersuchungen erforderlich.

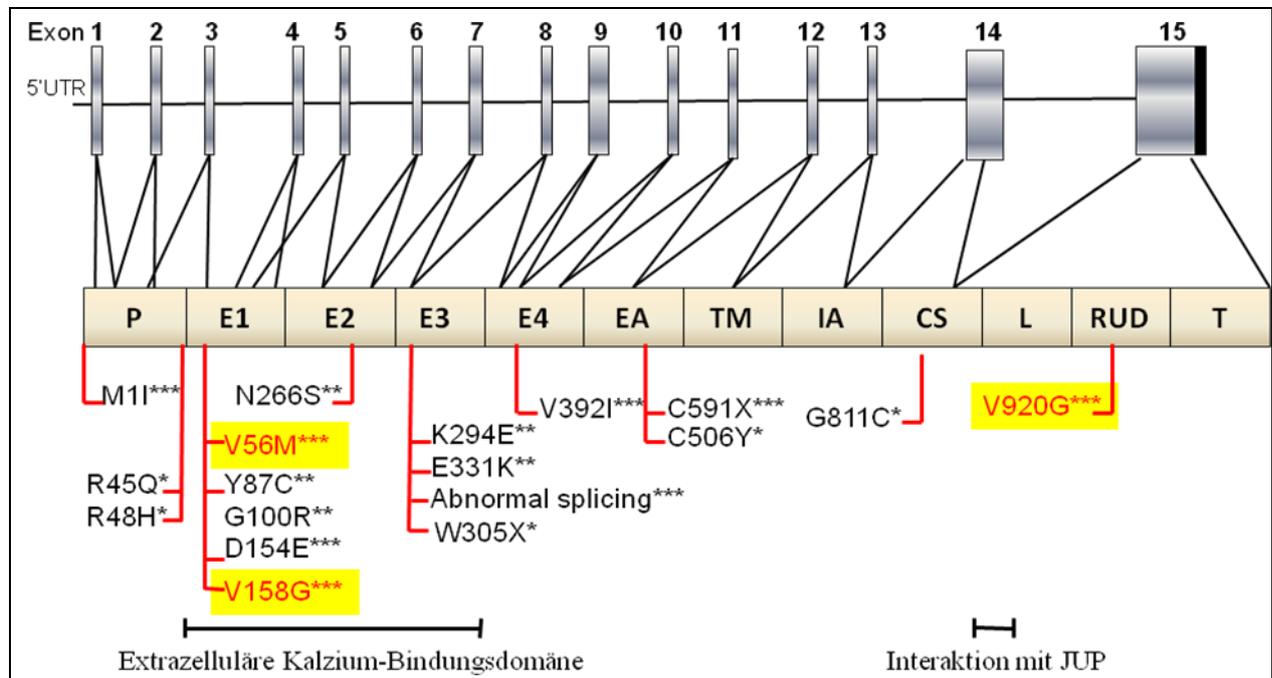
6.4.2 V56M - Hypothesen bezüglich molekularbiologischer Mechanismen

Die betroffene Aminosäure Valin, welche bei der Variante durch Methionin ersetzt wird, ist über verschiedenen Säugetierarten hinweg konserviert (Abb. 5.16 Ergebnisse). Der Unterschied der molekularen Größen der beiden Aminosäuren Methionin (MG: ~149,21) und Valin (MG: ~117,15) könnte eine Änderung der Tertiärstruktur des Proteins zur Folge haben. Die strukturellen Einflüsse der V56G Variante wurden in sich an diese Arbeit anschließenden Untersuchungen näher betrachtet. Die Strukturänderungen wurden mit Hilfe eines Modells der EC1 Domäne des DSG2 Proteins nachempfunden und zeigten eine Aufdehnung der betroffenen hydrophoben Tasche des Proteins⁶⁵.

Die Variante liegt im Exon 3 des DSG2, welches für die erste der drei extrazellulären Domänen (EC1) des Proteins kodiert. Diese Domänen sind für die Kalzium-abhängige Bindung zwischen den desmosmalen Kadherinen verantwortlich und zeigen innerhalb der Isoformen 1-4 des Desmoglein eine hohe Homologie³⁷. Pilichou et al. fanden neun krankheitsverursachende Varianten für ARVC/D im DSG2⁴⁹. Fünf dieser Varianten liegen ebenfalls in den extrazellulären Domänen am aminoterminalen Ende des Desmoglein. Auch Awad et al. untersuchten DSG2 in Patienten mit ARVC/D. Die Autoren beschreiben in ihrer Arbeit zwei Mutationen, welche in direkter Nachbarschaft mit der Variante V56M an Position 45 und 46 liegen⁴⁹. Die Region könnte demnach eine wichtige Bedeutung in der Pathogenese myokardialer Erkrankungen haben.

Abbildung 6.1

Varianten im Desmoglein-2 im schematischen Modell



P: precursor specific segment, E: extracellular repeat units, EA: extracellular anchoring domain, IA: intracellular ad, CS: cadherin-typical intracellular signal, L: linker domain, RUD: repeat unit domain (6rpts), TD: terminal domain;

*Pilichou et al.⁴⁵ **Awad et al.⁴⁹ ***Syrris et al.⁴⁷

Zu dem kardialen Phänotyp eines DSG2-Knockout-Modells gibt es bisher keine Daten, da der Verlust von DSG2 zum frühen embryonalen Tod der Mäuse (E5) führt⁵⁶. Awad et al fanden auf zellulärer Ebene bei drei DSG2 Mutationsträgern mit ARVC/D eine reduzierte Anzahl an Desmosomen⁴⁹.

Im Zuge sich an diese Arbeit anschließende Untersuchungen wurde Myokardgewebe des homozygoten Variantenträgers mit dem Myokardgewebe eines erkrankten Wildtyps verglichen. Elektronenmikroskopisch konnte gezeigt werden, dass die durchschnittliche Desmosomenlänge in der Myokardbiopsie des homozygoten V56M Indexpatienten gegenüber dem erkrankten Wildtyp ebenfalls signifikant verkürzt ist⁶⁵. Eine daraus resultierende verminderte zelluläre Stabilität und Einflussnahme auf die Pathogenese der DCM ist denkbar. Zudem zeigte die immunhistochemische Färbung von Myokard des Indexpatienten mit DSG2 Antikörper verglichen mit dem eines erkrankten Wildtyp eine weniger scharfe Struktur der *intercalated disc*.⁶⁵

Um die genaue funktionelle Auswirkung der Variante zu verstehen, sind weitere Untersuchungen insbesondere im Tiermodell notwendig.

7 Zusammenfassung

Die dilatative Kardiomyopathie (DCM) ist eine primäre Erkrankung des Herzmuskels und stellt mit einer Prävalenz von 36/100.000 die häufigste Ursache für eine Herztransplantation dar. In etwa 20-30% tritt die DCM familiär gehäuft auf. Die genetische Ätiologie der familiären DCM (fDCM) ist allerdings sehr heterogen und in der Mehrzahl der Patienten mit fDCM bleibt die zu Grunde liegende genetische Variante unklar. Von den bislang bekannten Krankheitsgenen für die fDCM kodieren die meisten für Proteine der kardialen Kraftproduktion und Impulsübertragung. Interessanterweise können Varianten in den gleichen Genen unterschiedliche Formen von Kardiomyopathien verursachen.

Desmoglein-2 (DSG2) ist ein Kalzium-bindendes transmembranäres Glykoprotein, welches in den kardialen Glanzstreifen lokalisiert ist und die zelluläre Kraftübertragung vermittelt. DSG2 wurde bereits als wichtiges Krankheitsgen für die arrhythmogene rechtsventrikuläre Kardiomyopathie (ARVC/D) identifiziert. Um zu untersuchen, ob Sequenzvarianten im DSG2 Gen auch bei der fDCM eine Rolle spielen, wurden die 15 kodierenden Exons bei 73 Patienten mit fDCM sequenziert und kodierende Varianten zusätzlich in 180 Kontrollprobanden untersucht.

Es konnten insgesamt 15 Varianten im DSG2 Gen identifiziert werden, darunter waren sechs kodierende. Zwei dieser kodierenden Varianten (V56M und V920G) waren in dem Kontrollkollektiv nicht nachweisbar. Interessanterweise wurden beide dieser Varianten kurz zuvor als ursächlich für die familiäre ARVC/D beschrieben. Die genetischen Analysen bei den betroffenen Angehörigen der beiden Variantenträger zeigten allerdings, dass nur die Variante V56M mit einem autosomal-dominanten Erbgang der fDCM innerhalb des Stammbaums vereinbar ist. Zudem konnte in einer Fall-Kontrollstudie mit 538 Patienten mit idiopathischer DCM und 432 Kontrollindividuen gezeigt werden, dass die V56M Variante signifikant mit dem Auftreten einer DCM assoziiert ist ($p > 0.007$). Die Variante V56M im DSG2 Gen könnte folglich eine neue Risikovariante für die DCM darstellen.

8 Literaturverzeichnis

- 1 Report of the WHO/ISFC task force on the definition and classification of cardiomyopathies. *Br Heart J* 1980; **44**: 672-673.
- 2 Richardson P, McKenna W, Bristow M *et al*: Report of the 1995 World Health Organization/International Society and Federation of Cardiology Task Force on the Definition and Classification of cardiomyopathies. *Circulation* 1996; **93**: 841-842.
- 3 Maron BJ, Towbin JA, Thiene G *et al*: Contemporary definitions and classification of the cardiomyopathies: an American Heart Association Scientific Statement from the Council on Clinical Cardiology, Heart Failure and Transplantation Committee; Quality of Care and Outcomes Research and Functional Genomics and Translational Biology Interdisciplinary Working Groups; and Council on Epidemiology and Prevention. *Circulation* 2006; **113**: 1807-1816.
- 4 Osterziel KJ, Hassfeld S, Geier C, Perrot A: [Familial dilated cardiomyopathy]. *Herz* 2005; **30**: 529-534.
- 5 Mestroni L, Maisch B, McKenna WJ *et al*: 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* 1999; **20**: 93-102.
- 6 Grunig E, Tasman JA, Kucherer H, Franz W, Kubler W, Katus HA: Frequency and phenotypes of familial dilated cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 1998; **31**: 186-194.
- 7 Taylor MR, Carniel E, Mestroni L: Cardiomyopathy, familial dilated. *Orphanet J Rare Dis* 2006; **1**: 27.
- 8 Battersby EJ, Glenner GG: Familial cardiomyopathy. *Am J Med* 1961; **30**: 382-391.
- 9 Schrader WH, Pankey GA, Davis RB, Theologides A: Familial idiopathic cardiomegaly. *Circulation* 1961; **24**: 599-606.
- 10 Whitfield AG: Familial cardiomyopathy. *Q J Med* 1961; **30**: 119-134.
- 11 Suomalainen A, Paetau A, Leinonen H, Majander A, Peltonen L, Somer H: Inherited idiopathic dilated cardiomyopathy with multiple deletions of mitochondrial DNA. *Lancet* 1992; **340**: 1319-1320.
- 12 Mestroni L, Rocco C, Gregori D *et al*: Familial dilated cardiomyopathy: evidence for genetic and phenotypic heterogeneity. Heart Muscle Disease Study Group. *J Am Coll Cardiol* 1999; **34**: 181-190.

- 13 Muntoni F, Cau M, Ganau A *et al*: Brief report: deletion of the dystrophin muscle-promoter region associated with X-linked dilated cardiomyopathy. *N Engl J Med* 1993; **329**: 921-925.
- 14 Murphy RT, Mogensen J, Shaw A, Kubo T, Hughes S, McKenna WJ: Novel mutation in cardiac troponin I in recessive idiopathic dilated cardiomyopathy. *Lancet* 2004; **363**: 371-372.
- 15 Norgett EE, Hatsell SJ, Carvajal-Huerta L *et al*: Recessive mutation in desmoplakin disrupts desmoplakin-intermediate filament interactions and causes dilated cardiomyopathy, woolly hair and keratoderma. *Hum Mol Genet* 2000; **9**: 2761-2766.
- 16 Seliem MA, Mansara KB, Palileo M, Ye X, Zhang Z, Benson DW: Evidence for autosomal recessive inheritance of infantile dilated cardiomyopathy: studies from the Eastern Province of Saudi Arabia. *Pediatr Res* 2000; **48**: 770-775.
- 17 Schonberger J, Seidman CE: Many roads lead to a broken heart: the genetics of dilated cardiomyopathy. *Am J Hum Genet* 2001; **69**: 249-260.
- 18 Karkkainen S, Peuhkurinen K: Genetics of dilated cardiomyopathy. *Ann Med* 2007; **39**: 91-107.
- 19 McKusick VA: Mendelian Inheritance in Man and its online version, OMIM. *Am J Hum Genet* 2007; **80**: 588-604.
- 20 Nigro V, de Sa Moreira E, Piluso G *et al*: Autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophy, LGMD2F, is caused by a mutation in the delta-sarcoglycan gene. *Nat Genet* 1996; **14**: 195-198.
- 21 Lim LE, Duclos F, Broux O *et al*: Beta-sarcoglycan: characterization and role in limb-girdle muscular dystrophy linked to 4q12. *Nat Genet* 1995; **11**: 257-265.
- 22 Muchir A, Bonne G, van der Kooi AJ *et al*: Identification of mutations in the gene encoding lamins A/C in autosomal dominant limb girdle muscular dystrophy with atrioventricular conduction disturbances (LGMD1B). *Hum Mol Genet* 2000; **9**: 1453-1459.
- 23 Bonne G, Di Barletta MR, Varnous S *et al*: Mutations in the gene encoding lamin A/C cause autosomal dominant Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Nat Genet* 1999; **21**: 285-288.
- 24 Fatkin D, MacRae C, Sasaki T *et al*: 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* 1999; **341**: 1715-1724.
- 25 Capell BC, Collins FS: Human laminopathies: nuclei gone genetically awry. *Nat Rev Genet* 2006; **7**: 940-952.

- 26 Kimura A, Harada H, Park JE *et al*: Mutations in the cardiac troponin I gene associated with hypertrophic cardiomyopathy. *Nat Genet* 1997; **16**: 379-382.
- 27 Mogensen J, Kubo T, Duque M *et al*: Idiopathic restrictive cardiomyopathy is part of the clinical expression of cardiac troponin I mutations. *J Clin Invest* 2003; **111**: 209-216.
- 28 Knoll R, Hoshijima M, Hoffman HM *et al*: The cardiac mechanical stretch sensor machinery involves a Z disc complex that is defective in a subset of human dilated cardiomyopathy. *Cell* 2002; **111**: 943-955.
- 29 Geier C, Perrot A, Ozcelik C *et al*: Mutations in the human muscle LIM protein gene in families with hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation* 2003; **107**: 1390-1395.
- 30 Klaassen S, Probst S, Oechslin E *et al*: Mutations in sarcomere protein genes in left ventricular noncompaction. *Circulation* 2008; **117**: 2893-2901.
- 31 Perrot A, Dietz R, Osterziel KJ: Is there a common genetic basis for all familial cardiomyopathies? *Eur J Heart Fail* 2007; **9**: 4-6.
- 32 Perriard JC, Hirschy A, Ehler E: Dilated cardiomyopathy: a disease of the intercalated disc? *Trends Cardiovasc Med* 2003; **13**: 30-38.
- 33 Ferreira-Cornwell MC, Luo Y, Narula N, Lenox JM, Lieberman M, Radice GL: Remodeling the intercalated disc leads to cardiomyopathy in mice misexpressing cadherins in the heart. *J Cell Sci* 2002; **115**: 1623-1634.
- 34 Olson TM, Illenberger S, Kishimoto NY, Huttelmaier S, Keating MT, Jockusch BM: Metavinculin mutations alter actin interaction in dilated cardiomyopathy. *Circulation* 2002; **105**: 431-437.
- 35 Ehler E, Horowitz R, Zuppinger C *et al*: Alterations at the intercalated disk associated with the absence of muscle LIM protein. *J Cell Biol* 2001; **153**: 763-772.
- 36 McGrath JA: Inherited disorders of desmosomes. *Australas J Dermatol* 2005; **46**: 221-229.
- 37 Schafer S, Koch PJ, Franke WW: Identification of the ubiquitous human desmoglein, DSG2, and the expression catalogue of the desmoglein subfamily of desmosomal cadherins. *Exp Cell Res* 1994; **211**: 391-399.
- 38 Sen-Chowdhry S, Syrris P, McKenna WJ: Role of genetic analysis in the management of patients with arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 2007; **50**: 1813-1821.
- 39 Chitaev NA, Averbakh AZ, Troyanovsky RB, Troyanovsky SM: Molecular organization of the desmoglein-plakoglobin complex. *J Cell Sci* 1998; **111 (Pt 14)**: 1941-1949.

- 40 Syed SE, Trinnaman B, Martin S, Major S, Hutchinson J, Magee AI: Molecular interactions between desmosomal cadherins. *Biochem J* 2002; **362**: 317-327.
- 41 Wang Y, Amagai M, Minoshima S *et al*: The human genes for desmogleins (DSG1 and DSG3) are located in a small region on chromosome 18q12. *Genomics* 1994; **20**: 492-495.
- 42 Rickman L, Simrak D, Stevens HP *et al*: N-terminal deletion in a desmosomal cadherin causes the autosomal dominant skin disease striate palmoplantar keratoderma. *Hum Mol Genet* 1999; **8**: 971-976.
- 43 Amagai M, Klaus-Kovtun V, Stanley JR: Autoantibodies against a novel epithelial cadherin in pemphigus vulgaris, a disease of cell adhesion. *Cell* 1991; **67**: 869-877.
- 44 Kljuic A, Bazzi H, Sundberg JP *et al*: Desmoglein 4 in hair follicle differentiation and epidermal adhesion: evidence from inherited hypotrichosis and acquired pemphigus vulgaris. *Cell* 2003; **113**: 249-260.
- 45 Pilichou K, Nava A, Basso C *et al*: Mutations in desmoglein-2 gene are associated with arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Circulation* 2006; **113**: 1171-1179.
- 46 Heuser A, Plovie ER, Ellinor PT *et al*: Mutant desmocollin-2 causes arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Am J Hum Genet* 2006; **79**: 1081-1088.
- 47 Syrris P, Ward D, Asimaki A *et al*: Desmoglein-2 mutations in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy: a genotype-phenotype characterization of familial disease. *Eur Heart J* 2007; **28**: 581-588.
- 48 Syrris P, Ward D, Evans A *et al*: Arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy associated with mutations in the desmosomal gene desmocollin-2. *Am J Hum Genet* 2006; **79**: 978-984.
- 49 Awad MM, Dalal D, Cho E *et al*: DSG2 mutations contribute to arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy. *Am J Hum Genet* 2006; **79**: 136-142.
- 50 Rampazzo A, Nava A, Malacrida S *et al*: Mutation in human desmoplakin domain binding to plakoglobin causes a dominant form of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Am J Hum Genet* 2002; **71**: 1200-1206.
- 51 Gerull B, Heuser A, Wichter T *et al*: Mutations in the desmosomal protein plakophilin-2 are common in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Nat Genet* 2004; **36**: 1162-1164.
- 52 McKoy G, Protonotarios N, Crosby A *et al*: Identification of a deletion in plakoglobin in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy with palmoplantar keratoderma and woolly hair (Naxos disease). *Lancet* 2000; **355**: 2119-2124.

- 53 Asimaki A, Syrris P, Wichter T, Matthias P, Saffitz JE, McKenna WJ: A novel dominant mutation in plakoglobin causes arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Am J Hum Genet* 2007; **81**: 964-973.
- 54 Vatta M, Marcus F, Towbin JA: Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy: a 'final common pathway' that defines clinical phenotype. *Eur Heart J* 2007; **28**: 529-530.
- 55 Kostetskii I, Li J, Xiong Y *et al*: Induced deletion of the N-cadherin gene in the heart leads to dissolution of the intercalated disc structure. *Circ Res* 2005; **96**: 346-354.
- 56 Eshkind L, Tian Q, Schmidt A, Franke WW, Windoffer R, Leube RE: Loss of desmoglein 2 suggests essential functions for early embryonic development and proliferation of embryonal stem cells. *Eur J Cell Biol* 2002; **81**: 592-598.
- 57 Vasile VC, Will ML, Ommen SR, Edwards WD, Olson TM, Ackerman MJ: Identification of a metavinculin missense mutation, R975W, associated with both hypertrophic and dilated cardiomyopathy. *Mol Genet Metab* 2006; **87**: 169-174.
- 58 Pearson PL: Restriction fragment length polymorphisms (RFLP's) and their use in mapping the human genome. *Prog Clin Biol Res* 1985; **177**: 23-36.
- 59 Grompe M: The rapid detection of unknown mutations in nucleic acids. *Nat Genet* 1993; **5**: 111-117.
- 60 Hayashi K, Yandell DW: How sensitive is PCR-SSCP? *Hum Mutat* 1993; **2**: 338-346.
- 61 Kakavas VK, Plageras P, Vlachos TA, Papaioannou A, Noulas VA: PCR-SSCP: a method for the molecular analysis of genetic diseases. *Mol Biotechnol* 2008; **38**: 155-163.
- 62 Perrot A, Hussein S, Ruppert V *et al*: Identification of mutational hot spots in LMNA encoding lamin A/C in patients with familial dilated cardiomyopathy. *Basic Res Cardiol* 2009; **104**: 90-99.
- 63 Posch MG, Perrot A, Dietz R *et al*: Mutations in MYOZ1 as well as MYOZ2 encoding the calsarcins are not associated with idiopathic and familial dilated cardiomyopathy. *Mol Genet Metab* 2007; **91**: 207-208.
- 64 Eshleman SH, Crutcher G, Petrauskene O *et al*: Sensitivity and specificity of the ViroSeq human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) genotyping system for detection of HIV-1 drug resistance mutations by use of an ABI PRISM 3100 genetic analyzer. *J Clin Microbiol* 2005; **43**: 813-817.
- 65 Posch MG, Posch MJ, Geier C *et al*: A missense variant in desmoglein-2 predisposes to dilated cardiomyopathy. *Mol Genet Metab* 2008; **95**: 74-80.

- 66 Condit CM, Achter PJ, Lauer I, Sefcovic E: The changing meanings of "mutation:" A contextualized study of public discourse. *Hum Mutat* 2002; **19**: 69-75.
- 67 Cotton RG: Communicating "mutation:" Modern meanings and connotations. *Hum Mutat* 2002; **19**: 2-3.
- 68 Marshall JH: On the changing meanings of "mutation". *Hum Mutat* 2002; **19**: 76-78.
- 69 Philips AV, Cooper TA: RNA processing and human disease. *Cell Mol Life Sci* 2000; **57**: 235-249.
- 70 Pickering BM, Willis AE: The implications of structured 5' untranslated regions on translation and disease. *Semin Cell Dev Biol* 2005; **16**: 39-47.
- 71 Awad MM, Dalal D, Tichnell C *et al*: Recessive arrhythmogenic right ventricular dysplasia due to novel cryptic splice mutation in PKP2. *Hum Mutat* 2006; **27**: 1157.
- 72 Chao HK, Hsiao KJ, Su TS: A silent mutation induces exon skipping in the phenylalanine hydroxylase gene in phenylketonuria. *Hum Genet* 2001; **108**: 14-19.
- 73 Montera M, Piaggio F, Marchese C *et al*: A silent mutation in exon 14 of the APC gene is associated with exon skipping in a FAP family. *J Med Genet* 2001; **38**: 863-867.
- 74 Biedermann K, Vogelsang H, Becker I *et al*: Desmoglein 2 is expressed abnormally rather than mutated in familial and sporadic gastric cancer. *J Pathol* 2005; **207**: 199-206.
- 75 Gerull B, Atherton J, Geupel A *et al*: Identification of a novel frameshift mutation in the giant muscle filament titin in a large Australian family with dilated cardiomyopathy. *J Mol Med* 2006; **84**: 478-483.
- 76 McKenna WJ, Thiene G, Nava A *et al*: Diagnosis of arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy. Task Force of the Working Group Myocardial and Pericardial Disease of the European Society of Cardiology and of the Scientific Council on Cardiomyopathies of the International Society and Federation of Cardiology. *Br Heart J* 1994; **71**: 215-218.
- 77 Pfeifer GP: Mutagenesis at methylated CpG sequences. *Curr Top Microbiol Immunol* 2006; **301**: 259-281.
- 78 Goldstein DB: Islands of linkage disequilibrium. *Nat Genet* 2001; **29**: 109-111.
- 79 Osterziel KJ: Genetische Diagnostik der Herzinsuffizienz. *Kardiologie update* 2005; **1**.

- 80 Small KM, Wagoner LE, Levin AM, Kardia SL, Liggett SB: Synergistic polymorphisms of beta1- and alpha2C-adrenergic receptors and the risk of congestive heart failure. *N Engl J Med* 2002; **347**: 1135-1142.
- 81 Lobmeyer MT, Gong Y, Terra SG *et al*: Synergistic polymorphisms of beta1 and alpha2C-adrenergic receptors and the influence on left ventricular ejection fraction response to beta-blocker therapy in heart failure. *Pharmacogenet Genomics* 2007; **17**: 277-282.
- 82 Cascorbi I, Paul M, Kroemer HK: Pharmacogenomics of heart failure -- focus on drug disposition and action. *Cardiovasc Res* 2004; **64**: 32-39.
- 83 Arimura T, Nakamura T, Hiroi S *et al*: Characterization of the human nebulin gene: a polymorphism in an actin-binding motif is associated with nonfamilial idiopathic dilated cardiomyopathy. *Hum Genet* 2000; **107**: 440-451.
- 84 Liu W, Li WM, Sun NL: HLA-DQA1, -DQB1 polymorphism and genetic susceptibility to idiopathic dilated cardiomyopathy in Hans of northern China. *Ann Hum Genet* 2005; **69**: 382-388.
- 85 Hiroi S, Harada H, Nishi H, Satoh M, Nagai R, Kimura A: Polymorphisms in the SOD2 and HLA-DRB1 genes are associated with nonfamilial idiopathic dilated cardiomyopathy in Japanese. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; **261**: 332-339.
- 86 Repetto A AS, Michele Pasotti, Alessandra Fontana, Alessandra Bertoletti, Laura Scelsi, Giulia Magrini, Lorenzo Monti, Carlo Campana, Stefano Ghio, Luigi Tavazzi, and Eloisa Arbustini Rescreening of "healthy" relatives of patients with dilated cardiomyopathy identifies subgroups at risk of developing the disease *Eur Heart J Suppl F* 2004; **6**: : F54-F60.
- 87 Suzuki M, Carlson KM, Marchuk DA, Rockman HA: Genetic modifier loci affecting survival and cardiac function in murine dilated cardiomyopathy. *Circulation* 2002; **105**: 1824-1829.
- 88 Arvanitis DA, Sanoudou D, Kolokathis F *et al*: The Ser96Ala variant in histidine-rich calcium-binding protein is associated with life-threatening ventricular arrhythmias in idiopathic dilated cardiomyopathy. *Eur Heart J* 2008; **29**: 2514-2525.
- 89 Le Corvoisier P, Park HY, Carlson KM, Marchuk DA, Rockman HA: Multiple quantitative trait loci modify the heart failure phenotype in murine cardiomyopathy. *Hum Mol Genet* 2003; **12**: 3097-3107.

9 Anhang

9.1 Abkürzungen

ABCC9:	ATP-sensitiver Kaliumkanal
ACTC :	kardiales α -Actin
ACTN2:	α -Actinin 2
AHA:	<i>American Heart Association</i>
AICD:	Automatischer implantierbarer Defibrillator
ARVD/C:	Arrhythmogene rechtsventrikuläre Dysplasie/Kardiomyopathie
AV-Block:	atrioventrikulärer-Block
bp:	Basenpaare
CSRP3:	Muscle-LIM-Protein
DCM:	Dilatative Kardiomyopathie
DES:	Desmin
DMD:	Dystrophin
DNS:	Desoxyribonukleinsäure
DSC:	Desmocollin
DSG:	Desmoglein
DSP:	Desmoplakin
ED:	Erstdiagnose
EDTA:	Ethylendiamintetraessigsäure
EKG:	Elektrokardiogramm
EYA4:	Eye absent homolog 4
fDCM:	familiäre Dilatative Kardiomyopathie
FS:	<i>Fractional shortening</i> /ventrikuläre Verkürzungsfraction
HCM:	Hypertrophe Kardiomyopathie
iDCM:	idiopathische Dilatative Kardiomyopathie
RCM:	Restriktive Kardiomyopathie
LDB3:	Cypher3/ZASP
LMNA:	Lamin A/C
LSB:	Linksschenkelblock
LVEDD:	linksventrikulärer enddiastolischer Durchmesser
LVEF:	linksventrikuläre Ejektionsfraktion

LVNC:	Linksventrikuläre Non-Compaction
MG:	Molekulargewicht
MYH7:	β -Myosin-Schwerkette
MYPC3:	Myosin-binding Protein C
PAA:	Polyacrylamid
PCR:	Polymerasekettenreaktion
PLN:	Phospholamban
PM:	Pacemaker/Schrittmacher
RFLP:	Restriktionslängenpolymorphismus
RNS :	Ribonukleinsäure
SA:	Standardabweichung
SCN5A:	Kardialer Natriumkanal 5°
SGCB:	β -Sakroglykan
SGCD:	δ -Sakroglykan
SNP:	Single nucleotide polymorphism
SSCP:	<i>Single stranded length polymorphism</i>
TAZ:	<i>Tafazzin</i>
TCAP:	Telethonin
TTNC1:	Troponin C
TTNI3:	Troponin I
TNNT2:	Troponin T
TPM1:	α -Tropomyosin
TTN:	Titin
UTR:	<i>untranslated region/untranslatierter Bereich</i>
VCL:	Metavinculin
WHO:	<i>World Health Organization</i>

9.2 Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1.1: Unterteilung der primären Kardiomyopathien
- Abbildung 1.2: Überschneidung von Krankheitsgenen verschiedener Kardiomyopathien
- Abbildung 1.3: Schematische Darstellung der demosomal Komponenten.
- Abbildung 5.1: Gelelektrophorese nach PCR im Gradientencycler.
- Abbildung 5.2 DNS-Sequenzierung der Variante c.209 G>A
- Abbildung 5.3 RFLP Analyse der Variante V56M
- Abbildung 5.4 DNS-Sequenzierung der Variante c.516 T>G
- Abbildung 5.5 RFLP-Analyse der Variante V158G
- Abbildung 5.6 DNS-Sequenzierung der Variante c.920 A>G
- Abbildung 5.7 RFLP-Analyse der Variante I293V
- Abbildung 5.8 DNS-Sequenzierung der Variante c.2180 G>A
- Abbildung 5.9 SSCP-Analyse der Variante E713K
- Abbildung 5.10 DNS-Sequenzierung der Variante c.2361 G>A
- Abbildung 5.11 RFLP-Analyse der Variante R773K
- Abbildung 5.12 DNS-Sequenzierung der Variante c.2802 T>G
- Abbildung 5.13 SSCP-Analyse der Variante V920G
- Abbildung 5.14 Stammbaum des Indexpatienten 4370
- Abbildung 5.15 Stammbäume der Indexpatienten 3454(A) und 4514(B)
- Abbildung 5.16 Konservierung der Aminosäure Valin an Position 56 über verschiedenen Säugetierarten
- Abbildung 5.17 Zusammensetzung der Kollektive der Assoziationsstudie
- Abbildung 5.18 DNS-Sequenzierung und RFLP-Analyse identifizierter Träger der Variante V56M
- Abbildung 6.1 Varianten im Desmoglein-2 im schematischen Modell

9.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1	Haupt- und Nebenkriterien für die Identifikation betroffener Angehöriger
Tabelle 1.2	Krankheitsgene und Genloci der DCM
Tabelle 3.1	Geräte
Tabelle 3.2	Lösungen
<i>Tabelle 4.1</i>	Ansatz für eine PCR
Tabelle 4.2	Übersicht über die verwendeten Vor- bzw. Rückwärts Primer, Fragmentlängen und der ermittelten Annealing-temperatur
Tabelle 4.3	PCR-Programm
Tabelle 4.4	Agarosegel
Tabelle 4.5	Cycle Sequencing Programm im Thermocycler
Tabelle 4.6	Ansatz für analytischen Restriktionsverdau
Tabelle 4.7	SSCP-Gele
Tabelle 5.1	Klinische Eigenschaften des untersuchten Patientenkollektivs
Tabelle 5.2	NCOI
Tabelle 5.3	BSAJI
Tabelle 5.4	Msl I
Tabelle 5.5	Afl II
Tabelle 5.6	Detektierte Varianten in dem fDCM Kollektiv
Tabelle 5.7	Verteilung der kodierenden SNPs in fDCM Kollektiv bzw. den Kontrollen
Tabelle 5.8	Ergebnis der Assoziationsstudie im zweiseitigen exakten Test nach Fisher
Tabelle 5.9	Ergebnis der Assoziationsstudie im zweiseitigen exakten Test nach Fisher unter Ausschluss der Kontrollen mit unbekanntem kardialen Phänotyp (Blutspender n=185)
Tabelle 5.10	Genotyp-Phänotyp Studie

9.4 Danksagung

Ich danke meinem Doktorvater Professor Dr. med. W. Haverkamp, meiner Familie,
insbesondere meinem Bruder Max, Nora und natürlich den Mitarbeitern des
kardiogenetischen Labors.

9.5 Lebenslauf

"Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht."

9.6 Publikationsliste

Posch MG, Posch MJ*, Perrot A, Dietz R, Ozcelik C. *Variations in DSG2: V56M, V158G and V920G are not pathogenic for arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy.*

Nat Clin Pract Cardiovasc Med. 2008; 5:E1

Posch MG*, Posch MJ*, Geier C, Erdmann B, Mueller W, Richter A, Ruppert V, Pankuweit S, Maisch B, Perrot A, Buttgereit J, Dietz R, Haverkamp W, Ozcelik C. *A missense variant in desmoglein-2 predisposes to dilated cardiomyopathy.*

Mol Genet Metab. 2008; 95:74-80 * gleichberechtigte Erstautorschaft

MJ. Posch, MG. Posch, V. Ruppert, A. Perrot, W. Müller, C. Geier, S. Pankuweit, W. Haverkamp, C. Özcelik. *Ein neuer funktioneller Polymorphismus im Desmoglein-2 Gen ist hochsignifikant mit dem Auftreten einer Dilatativen Kardiomyopathie assoziiert*

Clin Res Cardiol 2007 96: Suppl

9.7 Eidesstattliche Erklärung

Ich, Matthias Jakob Posch, erkläre, dass ich die hier vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Titel „*Genetische Varianten im Desmoglein-2 Gen bei Patienten mit familiärer dilatativer Kardiomyopathie*“ selbst und ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.

Matthias Posch

Berlin, den 25.01.2010