

Aus dem Deutschen Herzzentrum Berlin

DISSERTATION

**Mutationen und Polymorphismen im kardialen Troponin T Gen
bei Patienten mit hypertropher Kardiomyopathie**

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Sandra Wischke
aus Lüneburg

Gutachter: 1. Prof. Dr. med.V. Regitz-Zagrosek
2. Prof. Dr. med. Chr. Hengstenberg
3. Prof. Dr. med. H. Schunkert

Datum der Promotion: 11.08.2008

Eigene Veröffentlichungen

Teile der vorliegenden Arbeit wurden bereits an anderer Stelle veröffentlicht:

Erdmann, J.; Wischke, S.; Kallisch, H.; Riedel, K.; Heydenreich, M.; Fleck, E.; Regitz-Zagrosek, V. (1998): A novel missense Arg278Pro mutation in the Troponin T gene (*TNNT2*). Human Mutation 12:364-365

Erdmann, J.; Wischke, S.; Riedel, K.; Kallisch, H.; Fleck, E.; Regitz-Zagrosek, V. (1998): A new mutation (Arg278Pro) in the cardiac Troponin T gene (*TNNT2*) was identified in one patient with hypertrophic cardiomyopathy (HCM). Circulation, Abstracts from the 71th American Heart Association

Wischke, S.; Erdmann, J.; Heidenreich, M.; Kallisch, K.; Riedel, K.; Gerull, B.; Thierfelder, L.; Regitz-Zagrosek, V. (1998): Neue Variante im kardialen Troponin T Gen (*TNNT2*) bei Patienten mit hypertropher Kardiomyopathie (HCM). Z Kardiol 87,1; S. 14 (Abstract)

Wischke, S.; Erdmann, J.; Heidenreich, M.; Kallisch, K.; Riedel, K.; Gerull, B.; Thierfelder, L.; Fleck, E.; Regitz-Zagrosek, V. (1998): A new mutation in the cardiac troponin T gene (*TNNT2*) was identified in one patient with hypertrophic cardiomyopathy. European Heart Journal Vol. 19, S. 38

Erdmann, J.; Daehmlow, St.; Wischke, S.; Senyuva, M.; Werner, U.; Raible, J.; Tanis, N.; Dyachenko, S.; Hummel, M.; Hetzer, R.; Regitz-Zagrosek, V. (2003): Mutation Spectrum in a Large Cohort of Unrelated Consecutive Patients with Hypertrophic Cardiomyopathy. Clin. Genet. Oct; Vol. 64 (4), S. 339-349

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Kardiomyopathien	1
1.2. Hypertrophe Kardiomyopathie: Phänotyp und Häufigkeit	1
1.3. Molekulare Genetik der hypertrophen Kardiomyopathie	2
1.4. Das kardiale Troponin T: Funktion und Struktur	4
1.5. Beziehung zwischen Genotyp und Phänotyp der Mutationen im kardialen Troponin T Gen	5
1.6. Fragestellung	6
2. Materialien und Methoden	8
2.1. Materialien	8
2.1.1. Geräte	8
2.1.2. Chemikalien	8
2.2. Methoden	10
2.2.1. Experimentelle Strategie	10
2.2.2. Klinische Erfassung und Charakterisierung des Patientenkollektivs	11
2.2.3. Definieren der Vergleichskollektive	15
2.2.4. Gewinnung und Präparation menschlicher genomischer DNA	15
2.2.5. Molekulargenetische Methoden bei der Mutationssuche im <i>TNNT2</i>	16
2.2.5.1. Polymerase Kettenreaktion	16
2.2.5.2. Agarose-Gelelektrophorese	21
2.2.5.3. Einzelstrang-Konformationsanalyse	22
2.2.6. Klonierung von DNA-Fragmenten	24
2.2.6.1. Klonierung von Varianten im <i>TNNT2</i> mittels Plasmid Vektoren	25
2.2.6.2. Transformation von kompetenten <i>Escherichia coli</i> Zellen mit Plasmid-DNA	25
2.2.6.3. Insert-spezifische Polymerase-Kettenreaktion	26
2.2.6.4. Isolierung und Aufarbeitung der Plasmid-DNA	27
2.2.7. DNA-Sequenzierung	28
2.2.8. Nachweismethoden zur Genotypisierung der identifizierten Varianten	30

2.2.8.1.	Überblick über die Bestätigungsmethoden	30
2.2.8.2.	Heteroduplexanalyse	31
2.2.8.3.	Restriktionsfragmentlängen-Polymorphismus-Analyse	32
2.2.8.4.	Amplification Created Restriction Site-Assay	33
2.2.8.5.	Kontrollsequenzierung einzelner identifizierter Varianten	35
2.3.	Statistische Parameter	35
2.3.1.	Bestimmung der Allel- und Genotypverteilung mit dem Hardy-Weinberg-Gesetz	35
2.3.2.	χ^2 -Wert	37
3.	Ergebnisse	39
3.1.	Mutationen und Polymorphismen im kardialen Troponin T Gen	39
3.1.1.	Mutation Arg278Pro (CGC/CCC) (G833C)	42
3.1.2.	Variante IVS3 –11 (CTTCT) ₁ /(CTTCT) ₂	44
3.1.3.	Variante IVS5 –49 G/A	46
3.1.4.	Polymorphismus Ser69Ser (TCG/TCA) (G207A)	48
3.1.5.	Polymorphismus Ile106Ile (ATT/ATC)	50
3.1.6.	Variante IVS9 –97 (CCCCC/CCCC)	52
3.1.7.	Variante IVS11 –32 C/A	54
3.1.8.	Mutation Lys253Arg (AAG/AGG) (A758G)	56
3.1.9.	Variante IVS14 –33 T/C	57
3.1.10.	Variante +6 C/T 3'UTR	59
3.1.11.	Variante +67 G/A 3'UTR	61
3.1.12.	Ergebnisse der Untersuchungen in den Abschnitten 2, 5, 7 und 11 des kardialen Troponin T Gens	62
4.	Diskussion	63
4.1.	HCM eine klinisch heterogene Erkrankung	63
4.2.	Troponin T als Krankheitsgen für HCM	65
4.3.	Patientengut	66
4.4.	Methodik zur Mutationssuche	67
4.5.	Mutationen, seltene Varianten und Polymorphismen im <i>TNNT2</i>	70
4.5.1.	Mutationen	70
4.5.1.1.	Arg278Pro	70

4.5.1.2. Lys253Arg	72
4.5.2. Seltene Varianten	76
4.5.3. Polymorphismen im <i>TNNT2</i>	77
4.5.3.1. Ser69Ser	77
4.5.3.2. Ile106Ile	78
4.5.3.3. Weitere Sequenzänderungen im <i>TNNT2</i>	79
4.6. Spezielle Diskussion	79
4.6.1. Ergebnisse im untersuchten Kollektiv	79
4.6.2. Prognostische Voraussagen	80
5. Zusammenfassung	82
6. Anhang	84
6.1. Verzeichnis der Tabellen	84
6.2. Verzeichnis der Abbildungen	85
6.3. Abkürzungen	85
7. Literaturverzeichnis	88
8. Danksagung	95

1. Einleitung

1.1. Kardiomyopathien

Als Kardiomyopathien (CM) werden alle Erkrankungen des Herzmuskels bezeichnet, die mit einer kardialen Funktionsstörung einhergehen (WHO/ISFC 1995), welche nicht Folge einer koronaren Herzkrankheit, einer arteriellen Hypertonie, eines angeborenen oder erworbenen Vitiums oder einer Perikarderkrankung sind. Nach Art der myokardialen Dysfunktion werden sie unterteilt in dilatative (DCM), hypertrophe mit (HOCM) und ohne Obstruktion (HNCM), restriktive (RCM), arrhythmogene rechtsventrikuläre (ARVCM) und nicht-klassifizierbare (NKCM) Kardiomyopathie.

1.2. Hypertrophe Kardiomyopathie: Phänotyp und Häufigkeit

Die hypertrophe Kardiomyopathie, die hier in der vorliegenden Arbeit untersucht wird, ist eine weltweit vorkommende primär myokardiale Herzerkrankung mit linksventrikulärer Hypertrophie, Strukturverlust (disarray) der Myozyten und Myofibrillen und interstitieller Fibrose. Sie ist die häufigste Todesursache unter jungen Leistungssportlern und bedingt Mortalität und Morbidität in den höheren Altersstufen [Marian et al. (2001)]. Die Prävalenz liegt in der Allgemeinbevölkerung bei 0,2 % (1:500). Die jährliche Mortalität wird mit 3-5% in den Schwerpunktzentren sowie 0,5-1,5% in unselektierten Populationen angegeben [Towbin (1998)]. Sie tritt gehäuft familiär auf und wird in mind. 50% der Fälle autosomal-dominant vererbt. Ferner wurde bei vereinzelt Patienten eine sporadische („de-novo“-) Mutation nachgewiesen. Die klinische Progression ist sehr langsam und die Ausprägung der Symptome sehr variabel, mit dem höchsten Risiko am plötzlichen Herztod in Folge von Kammerflimmern zu versterben. In betroffenen Familien mit sicherem Überträgerstatus kommen auch asymptomatische Verläufe vor. Hierfür können unterschiedliche Umweltfaktoren, aber auch multifaktorielle genetische Veränderungen wie „modifier genes“, Polymorphismen in anderen Genen, die Ursache sein [Vosberg (1998)].

1.3. Molekulare Genetik der hypertrophen Kardiomyopathie

In den letzten Jahrzehnten ist die Kenntnis über die genetische Ursache kardiovaskulärer Erkrankungen einschließlich der HCM in unterschiedlichen Studien belegt worden [Hollman et al. (1960), Pare´ et al. (1961)]. Das erste krankheitsverursachende Gen konnte in einer großen kanadischen Familienuntersuchung für die schwere Kette des kardialen β -Myosins (*MYH7*, 14q12) auf dem langen Arm des Chromosoms 14 identifiziert werden [Jarcho et al. (1989)]. Am Beginn dieser Arbeit 1996 waren drei weitere Gene: Troponin T (*TNNT2*, 1q32), α -Tropomyosin (*TPM1*, 15q22.1) und das Myosinbindungsprotein C (*MYBPC3*, 11p11.2) identifiziert [Thierfelder et al. (1993), Watkins et al. (1993), Carrier et al. (1993)]. Diese Gene kodieren ausnahmslos für Proteine, die direkt oder indirekt als „Motorproteine“ oder als Kontrollfaktoren der Motilität der dünnen und dicken Filamente der Herzmuskulatur beteiligt sind. Dies führte zu der allgemeingültigen Definition, dass HCM eine Erkrankung des Sarkomers ist [Thierfelder et al. (1994)].

Durch Kopplungs- und Kandidatengenanalysen konnten bis heute über 300 verschiedene Mutationen in 14 Genen, die für kontraktile Sarkomerproteine sowie nicht-Sarkomerproteine kodieren und 1 Mutation im mitochondrialen Genom, die alle für HCM ursächlich sind, identifiziert werden [Marian et al. (2001), Erdmann et al. (2006)]. In der folgenden Übersichtstabelle (Tab.1) sind die einzelnen Gene mit der Anzahl und Art der bereits bekannten Mutationen und der prozentualen Verteilung ihrer Ursache an HCM beteiligt zu sein aufgelistet.

Gen	Symbol	Locus	Mutationen
β-Myosin schwere Kette	<i>MYH7</i>	14q12	~175
α-Myosin schwere Kette	<i>MYH6</i>	14q11.2-q13	2
essentielle leichte Myosinkette	<i>MYL3</i>	3p21.3-p21.2	5
Regulatorische leichte Myosinkette	<i>MYL2</i>	12q23-q24.3	10
Myosin Bindungsprotein-C	<i>MYBPC3</i>	11p11.2	137
kardiales Troponin T	<i>TNNT2</i>	1q32	27
kardiales Troponin C	<i>TNNC1</i>	3p21.1	1
α-Tropomyosin	<i>TPM1</i>	15q22.1	11
kardiales Troponin I	<i>TNNI3</i>	19p13.2	26
kardiales α-Aktin	<i>ACTC</i>	15q11-q14	7
Titin	<i>TTN</i>	2q31.2	2
Telethonin	<i>TCAP</i>	17q12	2
Caveolin-3	<i>CAV3</i>	3p25	1

Tab.1: Für HCM verantwortliche Gene, Gensymbol, ihre Lokalisation und gefundenen Mutationen [angelehnt an Marian et al. (2001), Erdmann et al. (2006)], korrigiert durch <http://www.angis.org.au/Databases/Heart/dbsearch.html> und <http://www.genecards.org> sowie <http://www.gene.ucl.ac.uk>

1.4. Das kardiale Troponin T: Funktion und Struktur

Das kardiale Troponin T (*TNNT2*), in dieser Studie im speziellen betrachtet, ist ein Protein des dünnen Filamentes des Sarkomers, welches eine komplexe Struktur mit einer exakten Stoichiometrie und unterschiedlich vielen Verbindungen von Protein-Protein Interaktionen darstellt. *TNNT2* spielt bei der Regulation des Querbrückenmechanismus zusammen mit Troponin C und I sowie α -Tropomyosin eine entscheidende Rolle. In Anwesenheit von intrazellulärem Calcium ($\geq 10^{-7}$ mol/l) wird die Molekülkonformation des heterotrimeren Troponinkomplexes, bestehend aus dem direkt inhibitorisch auf die Aktin-Myosin-Verbindung wirkendem Troponin I, dem Ca-bindendem Troponin C, welches je nach intrazellulärer Ca-Konzentration die Aktin-Myosin-Interaktion reguliert und dem an das α -Tropomyosin bindenden Troponin T, verändert und via α -Tropomyosin die Aktin-Myosin-Interaktion in Form eines Querbrückenschlages freigegeben [Schmidt (1995), Bonne et al. (1998)].

Das kardiale Troponin T lokalisiert auf Chromosom 1q32 kommt in verschiedenen Isoformen, wie viele myofibrilläre Proteine, durch unterschiedliche Gene oder Splice-Varianten des primären RNA-Transkriptes vor. Der zuletzt genannte Mechanismus ist verantwortlich für die breite Varianz innerhalb des *TNNT2*, welches während der ontogenetischen Entwicklung eine unterschiedliche Expression erfährt. Daraus ergeben sich multiple Konformationen im humanen fetalen und adulten Herz sowie in humaner skeletaler Muskulatur und in unterschiedlichen Spezies [Breitbart et al. (1985), Jin et al. (1992), Gahlmann et al. (1987), Mesnard et al. (1993), Anderson et al. (1995)].

In Anlehnung an die Sequenz des kardialen Troponin T Gens der Ratte [Jin et al. (1992)] legte die Arbeitsgruppe von L. Thierfelder für ihr Mutationsscreening die Nummerierung der einzelnen Exonabschnitte fest [Gerull et al. (1998), Protein accession no. AAC39590, complete cds AF004409.1-AF004422.1]. Durch Sequenzierung mittels *TNNT2* cDNA Oligonukleotidprimern (GDB S64668) [Mesnard et al. (1993)] konnte die genomische Struktur von 15 *TNNT2* Exonabschnitten der adulten Isoform identifiziert werden. Die Größe der einzelnen Exone variiert dabei von 9-237 Bp-Länge bei einer Verteilung von 14,5 kB genomischer DNA (s. Abb. 7, S. 41 im Ergebnisteil). Das Startkodon liegt im Exon 2, somit ergibt sich eine Kodonanzahl von 288.

Basierend auf diesen damals noch unveröffentlichten Daten, konnten für die vorliegende Arbeit Oligonukleotidprimer für die Intron-Exon-Abschnitte im kardialen *TNNT2* anlehnend an diese Nummerierung synthetisiert werden und für das anschließende Mutationsscreening verwendet werden.

1.5. Beziehung zwischen Genotyp und Phänotyp der Mutationen im kardialen Troponin T Gen

Auf Grund molekulargenetischer Untersuchungen an Familien mit hypertropher Kardiomyopathie konnte festgestellt werden, dass verschiedene Mutationen in unterschiedlichen Genen, die für Sarkomerproteine und nicht-Sarkomerproteine kodieren, ursächlich mit der Erkrankung im Zusammenhang stehen. Zum Zeitpunkt der Untersuchung beschränkten sich genetische Analysen und prozentuale Verteilungen auf die bis dahin in Familien identifizierten Gene *MYHH7*, *TNNT2*, *TPM1* und *MYBPC3*. Die molekularen Krankheitsmechanismen unterscheiden sich je nach Gen in ihrem Ausmaß und klinischen Verlauf, wobei einige Studien vermuten lassen, dass einige Mutationen mit einem charakteristischen Phänotyp assoziiert sind. Die Klinik der Patienten mit Mutationen im β -Myosin Gen ist sehr heterogen. Einige Punktmutationen (Val606Met, Leu908Val) zeigen einen sehr milden Krankheitsverlauf und haben dadurch eine gute Prognose. Dagegen sind die Mutationen Arg403Gln und Arg249Gln mit einer hohen Inzidenz des plötzlichen Herztodes assoziiert [Anan et al. (1994)]. *MYBPC3* und α -Tropomyosin Mutationen zeigen geringe Krankheitspenetranz mit spätem Beginn, milde Form der linksventrikulären Hypertrophie und nur eine geringe Inzidenz des plötzlichen Herztodes [Watkins et al. (1995b)].

Im kardialen Troponin T Gen berichteten zuerst Thierfelder et al. (1994) und Watkins et al. (1995a) über Mutationen bei familiärer hypertropher Kardiomyopathie. Hierbei wurden zumeist kleinere Familien mit mehreren manifest erkrankten Personen, manchmal auch nur die Indexpatienten in den betroffenen Familien und gelegentlich auch sporadische Fälle untersucht. Annahmen zur prozentualen Verteilung der Mutationen im *TNNT2* stützen sich bisher nur auf diese aufgefundenen Familien. Die prozentuale Verteilung wird für *TNNT2* auf ca. 15-20 % geschätzt [Watkins et al. (1995a), Marian et al. (2001)]. Insgesamt konnten bis heute 27 Mutationen identifiziert werden. Dabei handelt es sich überwiegend um Punktmutationen, die zu Aminosäureaustauschen führen. Ferner gibt es zwei Deletionen eines Kodons sowie eine

Punktmutation in einem Intron, aus der auf ein aberrantes Prozessieren (splicing) der mRNA geschlossen werden kann [Moolman et al. (1997), Thierfelder et al. (1994), Marian et al. (2001)]. Im Kodon 92 des *TNNT2* konnten insgesamt drei verschiedene Basenaustausche beschrieben werden, die eine Substitution von Arginin durch Glutamin, Tryptophan oder Leucin veranlassen. Daher wird dieser Bereich als Hotspot für Mutationen bezeichnet [Forissier et al. (1996)]. Wie oben bereits erwähnt, variiert die klinische Manifestation der HCM in der Ausprägung von einem benignen asymptomatischen Verlauf bis hin zu Herzversagen und plötzlichem Herztod. Besonders bei *TNNT2* Mutationen wird beobachtet, dass der Verlauf der linksventrikulären Hypertrophie gering bis subklinisch verlaufen kann. Im Gegensatz zu Mutationen in den anderen Kandidatengenen ist die Inzidenz des plötzlichen Herztodes in dieser Gruppe von HCM Patienten besonders bei jungen Leistungssportlern sehr hoch. Zahlreiche Studien wurden durchgeführt, um die strukturellen und kontraktile Veränderungen bedingt durch Mutationen im kardialen Troponin T zu belegen. Tardiff et al. (1998) zeigte z.B. an transgenen Mäusen mit trunziertem C-terminalen *TNNT2* Allel, dass diese phänotypisch eine Kardiomyopathie mit signifikanten hämodynamischen Störungen entwickelten. Des weiteren testeten Studien an isolierten adulten Kardiomyozyten mit I79N und R92Q Mutationen die molekularen Mechanismen der Pathogenese von Troponin T bedingter HCM [Rust et al. (1999)].

1.6. Fragestellung

In unterschiedlichen Studien konnte in den letzten Jahrzehnten die genetische Ursache kardiovaskulärer Erkrankungen einschließlich der HCM belegt werden. Auf Grund molekulargenetischer Untersuchungen an Familien mit hypertropher Kardiomyopathie konnte festgestellt werden, dass verschiedene Mutationen in unterschiedlichen Genen, die für Sarkomerproteine und nicht-Sarkomerproteine kodieren, ursächlich mit der Erkrankung im Zusammenhang stehen. Zum Zeitpunkt der Studie im Jahre 1996 waren ausschließlich molekulargenetische Ergebnisse an Familien mit hypertropher Kardiomyopathie vorliegend. Sie beschränkten sich mit ihren genetischen Analysen und prozentualen Verteilungen auf die bis dahin in Familien identifizierten Gene *MYHH7*, *TNNT2*, *TPM1* und *MYBPC3*.

Durch eine zuvor erstellte Promotionsarbeit aus dieser Arbeitsgruppe, wurden klinisch relevante Daten über unabhängige, konsekutive Patientenkollektive mit HCM und DCM erfasst. Diese Patientenkollektive wurden nun für weitere molekulargenetische Untersuchungen durch die

Arbeitsgruppe genutzt. Es sollte nun im Einzelnen geprüft werden, wie die prozentuale Verteilung von Mutationen in den oben genannten Kandidatengenen für HCM in einem unabhängigen, konsekutiven Patientenkollektiv mit klinisch nachgewiesener HCM wäre . In dieser Arbeit wurde nun ein Mutationsscreening im kardialen Troponin T Gen an einem unabhängigen, konsekutiven Patientenkollektiv mit hypertropher Kardiomyopathie durchgeführt.

2. Materialien und Methoden

2.1. Materialien

2.1.1 Geräte

Abzug	Typ FAZ 1, Waldner Electronics, Wangen
Autoclav	Varioclav Typ 500, H+P Labortechnik, München
Brutschrank	Heraeus Instruments UT 20, Berlin
Elektrophoresekammern	BlueMarine 200, Boehringer, Ingelheim Horizon 58, Gibco BRL „Eggenstein Multilong, Typ G 47, Biometra, Göttingen
Geldokumentationsanlage	TI 3, BioDoc II™, BioDoc CCD-Camera, Biometra, Göttingen
Gelrockner	Drystar, Holzelt, Deutschland
Laborwaage	Typ PG5002 Delta Range®, Mettler Toledo, Schweiz Typ 1712004, Sartorius, Göttingen
Magnetrührer	Typ MR 3001 K, Heidolph, München
Mikrowelle	Micromat, AEG Typ EEH 8733
PCR-Geräte	Cetus DNA Gene Amp 9600, Perkin Elmer, Weiterstadt
Photometer	Ultrospec® 2000, Pharmacia Biotech, Cambridge, England
Schüttelinkubator	Typ GFL 3033, Burgwedel
Schüttler	Typ SM25, Edmund Bühler, Tübingen
Sequenzierer	ABI Prism™ 377 DNA-Sequencer, Perkin Elmer, Weiterstadt
Spannungsgeräte	Electrophoresis Power Supply, Pharmacia Biotech, Freiburg PS 3002, Gibco BRL, Eggenstein
Sterile Werkbank	Lamin Air, HBB 2448, Heraeus Instruments, Berlin
Vortex Mixer	Typ REA X 2000, Heidolph, München
Wasserbäder	GFL Typ 1002, Burgwedel Typ WB 7. Memmert, Schwabach
Zentrifugen	Tischzentrifuge Typ 5417 R, Eppendorf, Hamburg Megafuge 1.0 R, Heraeus Instruments, Berlin

2.1.2. Chemikalien

Amresco®, Ohio, USA	Acryl-40 Solution, Bis-2 Solution
Biozym, Hameln	Agarose Universal
Braun, Melsungen	Aqua ad injectabilia
Gibco BRL, Eggenstein	PBS „ohne“ Dulbecco's (w/o calcium and magnesium, w/o sodium bicarbonat), 5X First Strand Buffer, TRIzol™ Reagenz, DTT (Dithiotreitol), Random Primers, dNTP's (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), LB Agar, SOC Medium
Invitek, Berlin	OptiPerform™ Buffer III (10x), OptiZyme™ Enhancer (5x)
MBI Fermentas, Vilnius	Buffer R, BSA
Merck, Darmstadt	Borsäure, Bromphenolblau, Chloroform, Na-EDTA, Essigsäure, Ethanol, Formaldehyd, Formamid, Isopropanol, Natriumcarbonat, Silbernitrat, Salpetersäure, Tris Base (Trishydroxymethyl)-aminomethan), Titriplex®III (Ethylendinitrilotetraessigsäure, Dinatriumsalz-Dihydrat)

Pharmacia, Freiburg	Ficoll 400
Serva, Heidelberg	Ethidiumbromid, TEMED
Sigma, Deisenhofen	Ammoniumacetat, Ampicillin, APS (Ammoniumpersulfat), Ethidiumbromid, Diethylpyrocarbonat, Formaldehyd, Harnstoff, SDS (Sodium Dodecyl Sulfat)
Boehringer, Mannheim	DNA Molecular Weight Marker VI Molecular Weight Marker XIII (50 basis pair ladder)
Gibco BRL, Eggenstein	SuperScript™ II, TaqDNA-Polymerase (recombinant), 100 Bp-DNA-Ladder, λ X 174 RF DNA/Hae III Fragments
MBI Fermentas, Vilnius	<i>Hinfl</i> , RNase Inhibitor
Sigma, Deisenhofen	Proteinase K
SSCP-Marker	λ DNA-Hind III digest.
Filterpapier	Whatman 3MM GF/C Filter Whatman Nr.1822915, Maidstone, England
Gelfilter	Quiagen-tip 20®, Quiagen, Hilden Sephadex G 50®, Pharmacia Biotech, Freiburg
Kits	TA TOPO Cloning Kit, Invitrogen, Leek, Niederlande Quiagen Plasmid Mini Kit, Quiagen, Hilden Prism™ Ready Reaction DyeDeoxy™ Terminator Cycle Sequencing Kit, Applied Biosystems (ABI)
Kompetente Zellen	Kompetente E. coli Zellen Genotyp Top 10, Invitrogen, Leek. Niederlande
Vektor	PCR® 2.1-TOPO, Invitrogen, Leek, Niederlande

2.2. Methoden

2.2.1. Experimentelle Strategie

In die initiale Mutationssuche im kardialen Troponin T Gen wurden insgesamt 63 konsekutive Patienten eines Überweisungskrankenhauses mit hypertropher Kardiomyopathie (HCM) mit und ohne Obstruktion der Ausflussbahn eingeschlossen. Diese Patienten wurden im Rahmen einer zuvor erstellten klinischen Promotionsarbeit ermittelt. Die damals gesammelten klinischen Daten wurden in den Jahren 1996 bis 1998 aktualisiert und erfasst. Die Diagnose der Patienten basierte auf Klinik (Ausschluss anderer Hypertrophieursachen) nach international anerkannten Kriterien (Literatur), 24h-EKG, Echokardiographie (LVH Septum > 13 mm) und Angiographie. Patienten, bei denen bereits eine Myektomie durchgeführt wurde, wurden unabhängig von echokardiographischen Kriterien akzeptiert. Als Kontrollgruppe wurden für die Arbeit zusätzlich 48 Patienten des gleichen Krankenhauses mit dilatativer Kardiomyopathie (DCM) genotypisiert. Auch diese klinischen Daten wurden bei Relevanz für die vorliegende Arbeit überprüft und aktualisiert (1996-1998). Zusätzlich wurden noch 46 Blutspender aus dem gleichen Zeitraum als Kontrollgruppe genotypisiert. Die Blutspender aus der Blutbank des Universitätsklinikums Rudolph Virchow der Humboldt-Universität zu Berlin wurden nach dem Zufallsprinzip ausgewählt. Sie wiesen keine manifesten Gesundheitsstörungen und keine auffälligen Laborbefunde auf. Aus datenschutzrechtlichen Gründen können keine weiteren Angaben zu diesen Proben gemacht werden. Alle Personen sind nicht miteinander verwandt. Die in die Studie aufgenommenen Patienten waren vor der Blutabnahme über die geplanten molekulargenetischen Untersuchungen aufgeklärt worden und hatten ihr schriftliches Einverständnis zur Verwendung ihrer DNA für diese Untersuchung gegeben. Die Studie wurde von der zuständigen Ethikkommission geprüft und genehmigt.

Zuerst wurden die einzelnen Exone, die den kodierenden Bereich des *TNNT2*-Gen repräsentieren, mittels synthetischer Oligonukleotide (s. Tab. 2, S. 18) amplifiziert. Nach erfolgreicher Darstellung spezifischer Banden in der PCR-Analyse wurde mittels der SSCP-Technik ein Mutationsscreening auf Polyacrylamid-Gelen bei zwei unterschiedlichen Temperaturen (Raumtemperatur und 4°C) durchgeführt. Durch anschließendes Färben der Gele mit Silber nach Standardprotokollen und nach dem Trocknen konnten die Gele nach einzelnen Laufmusterunterschieden ausgewertet werden. Zeigten sich hierbei Abweichungen im Bandenmuster, so wurden für die anschließende Klonierung und Sequenzierung das auffällige PCR-Produkt der betreffenden Person und ein PCR-Amplifikat, welches wahrscheinlich das

Wildtyp-Allel beinhaltet, ausgewählt. Diese Fragmente wurden dann in den Plasmidvektor pCR[®]2.1.-TOPO mittels kompetenter Zellen (E. coli Zellen Genotyp Top 10 von Invitrogen) kloniert. Nach Inkubation des Transformationsansatzes bei 37°C über Nacht konnten dann am folgenden Tage ca. 20 Kolonien mit Hilfe der Insert-spezifischen PCR amplifiziert werden. Nach erneuter Polyacrylamidgelanalyse erfolgte die Identifikation der unterschiedlichen Allele. Die nun folgende Sequenzierung nach der Methode von Sanger (1977) gibt Aufschluss über die tatsächliche amplifizierte genomische Sequenz. Durch den Vergleich der einzelnen sequenzierten Abschnitte konnten die Varianten identifiziert und charakterisiert werden. Weiterhin erfolgte ein Vergleich mit denen in der Literatur bereits veröffentlichten Mutationen im *TNNT2*. Eine weitere Bestätigung durch anschließende Nachweismethoden erfolgte im gesamten Probandenkollektiv.

2.2.2. Klinische Erfassung und Charakterisierung des Patientenkollektivs

Das in der Studie untersuchte Patientenkollektiv setzte sich aus 63 konsekutiven Patienten eines Überweisungskrankenhauses mit hypertropher Kardiomyopathie (HCM) zusammen. Der Nachweis und die Lokalisation einer myokardialen Hypertrophie mit nicht-invasiven und invasiven Untersuchungsmethoden wird im folgenden näher erläutert.

Die Diagnose der hypertrophen Kardiomyopathie basiert heute vor allem auf dem Nachweis einer Hypertrophie des linken Ventrikels, bes. im Septumbereich mit und ohne Obstruktion der linksventrikulären Ausflussbahn in der zweidimensionalen Echokardiographie (Echo) bei Ausschluss anderer Ursachen [McKenna et al. (1997), Vosberg (1998)]. Die Zunahme der Hypertrophie ist regional begrenzt und asymmetrisch mit sanduhrförmiger Einengung des linken Ventrikellumens. Eine Septumdicke (IVS) größer als 13 mm gilt als krankheitsverdächtig [Charron et al. (1997)]. Die Hypertrophie bei Patienten mit einem bekannten Hypertonus ist mit Septumdicken nie größer 20 mm und mit einer symmetrischen Verteilung der Herzmuskelhypertrophie charakterisiert. Das Verhältnis aus Septumdicke und linksventrikulärer Hinterwand (HW) $> 1,6$ ist als pathologisch zu werten [Herold et al. (1999)]. Ebenfalls können bei der Echokardiographie globale und regionale Funktionsstörungen des Herzmuskels, die systolische Vorwärtsbewegung des vorderen Mitralsegels im M-Mode, sie ist hinweisend auf eine Ausflussbahnobstruktion, Vitien sowie ein intrakavitärer Druckgradient im Doppler-Echo ermittelt werden.

Weiter diagnostisch relevant sind Krankheitszeichen im 12-Kanal Elektrokardiogramm (EKG), die einer echokardiographisch nachweisbaren Veränderung lange vorausgehen können. Zeichen der linksventrikulären Hypertrophie nach dem Sokolow-Lyon-Index ($> 3,5$ mV), Veränderungen der ST-Strecke und der T-Welle bei Fehlen von intraventrikulären Blockierungen sowie das Auftreten von pathologischen Q-Zacken in mindestens zwei Ableitungen können hinweisend für eine HCM sein. Diese sind aber nicht spezifisch, da sie auch bei anderen Erkrankungen auftreten können. Supra- und ventrikuläre Arrhythmien sowie Bradyarrhythmien, die auf einen schwerwiegenden Verlauf hindeuten und mit einem hohen Risiko einen plötzlichen Herztod zu erleiden, können mittels 24h-Langzeit-EKG aufgedeckt werden [Schwartz et al. (1995)].

Das Verhalten von Blutdruck und Herzfrequenz sowie das Auftreten von höhergradigen Rhythmusstörungen unter körperlicher Belastung kann unter kontrollierten Bedingungen bei der Fahrradergometrie beurteilt werden. Dabei sind ein Abfall der Blutdruckwerte (RR) um 20 mmHg als bedenklich anzusehen. Bei Patienten mit einem Alter unter 40 Jahren ist ein Abfall einhergehend mit einem erhöhten Risiko am plötzlichen Herztod zu versterben (Sensitivität 75%, Spezifität 60%). Eine belastungsinduzierte Ischämie kann ebenfalls aufgedeckt werden [Sadoul et al. (1997), Fananapazir (1999)].

Eine invasive Diagnostik ist indiziert bei symptomatischen Patienten zum Ausschluss anderer Herzerkrankungen z.B. Koronare Herzerkrankung, Speicherkrankheiten oder vor geplanten Interventionen. Die perkutane transluminale Angiographie bietet die Möglichkeit den erhöhten diastolischen Füllungsdruck des linken Ventrikels infolge reduzierter Dehnbarkeit des hypertrophischen Myokards und ein kleines Kavum zu erfassen. Die gemessene Auswurfraction liegt mit 70-80 % über der Norm (55-75%). Veränderungen an den Koronarien können ausgeschlossen werden. Ein intraventrikulärer Druckgradient kann beim Vergleich der Füllungsdrucke in den einzelnen Herzhöhlen gemessen und durch Gabe von Nitroglyzerin verstärkt werden.

Eine Biopsie des Myokards zeigt die für die hypertrophe Kardiomyopathie typischen Veränderungen der Myozyten- und Myofibrillenstruktur und sichert die Diagnose. Der Verlust der regelmäßigen und parallelen Anordnung der Kardiozyten (disarray), asymmetrische Hypertrophie, interstitielle Fibrosierung sowie Verdickung in der Media kleiner Arterien sind charakteristisch. Zusätzlich kommt es zu einer Vermehrung der Mitochondrien und zu einer Verbreiterung der Z-Streifen [Vosberg (1998)].

Die Klinik der Patienten mit HCM ist sehr unterschiedlich und die Diagnose meist ein Zufallsbefund. Typische Symptome sind Belastungsdyspnoe und Angina pectoris, die in ihrer Stärke wechselnden Charakters sein können und durch das Auftreten einer absoluten Arrhythmie bei Vorhofflimmern verstärkt werden. Asymptomatische Verläufe werden ebenfalls vermerkt sowie fakultative Symptome wie unspezifische Herzbeschwerden, Arrhythmien (SVT, AF, VES, VT), Schwindel, Leistungsminderung, rasche Ermüdbarkeit, Synkopen und das Auftreten eines unerwarteten plötzlichen Herztodes, welches in einigen Fällen der erste Hinweis für die Erkrankung ist [Gleichmann et al. (1998)].

Das therapeutische Ziel bei Patienten mit HCM ist die symptomatische Linderung mit Verbesserung der Lebensqualität, die Prävention und Reduktion kardiovaskulärer Komplikationen. Hierbei stehen die zunächst konservativen Maßnahmen im Vordergrund, um besonders bei Patienten mit HOCM eine Verringerung des Ausflussbahngradienten zu erreichen. Die Patienten sollten schwere körperliche Anstrengung und Hochleistungssport meiden. Medikamentös kommen bevorzugt negativ inotrope Substanzen wie Betablocker und Calciumantagonisten vom Verapamil-Typ zum Einsatz [Schulte et al. (1999)]. Beim Auftreten von Vorhofflimmern ist die Gabe von Antikoagulantien zu empfehlen.

Die interventionelle Therapie kommt zum Einsatz bei Patienten, die trotz medikamentöser Therapie weiter symptomatisch sind. Dies ist der kleinere Anteil der HCM-Patienten. Die septale Myotomie-Myektomie muss selten durchgeführt werden. Hierbei kann mittels transventrikulärem oder transaortalem Zugang Anteile des hypertrophierten Septums entfernt werden. Das Operationsrisiko ist mit 5 % als hoch einzuschätzen [Harrison et al. (1996)]. Durch eine Zwei-Kammer-Stimulation mit einem Herzschrittmacher (DCP) kann das Ventrikelseptum so stimuliert werden, dass es sich kurz vor der übrigen Kammermuskulatur kontrahiert und somit die Obstruktion im Ausflusstrakt vermindert wird. Eine generelle Empfehlung für den Einsatz gibt es nicht. Bei lebensbedrohlichen ventrikulären Arrhythmien und nach überlebtem plötzlichen Herztod wird therapeutisch ein Kardioverter-Defibrillator (AICD) implantiert. Alternativ kann die transkoronare Ablation der septalen Hypertrophie (TASH) mit der selektiven Injektion 95 %igem Alkohols in den 1. Septalast die Ausflussbahnobstruktion reduzieren, wobei die Komplikationsrate von der Erfahrung des durchführenden Zentrums abhängt [Schulte et al. (1999)].

Die Diagnose von den von uns untersuchten 63 konsekutiven Patienten (m = 46, w = 17, Alter im Mittel zum Zeitpunkt der Untersuchung (1996-1998) war $58 \pm 12,95$ Jahre) mit HCM aus

einem Überweisungskrankenhaus basierte auf Klinik (Ausschluss anderer Hypertrophiezeichen), Echokardiographie (linksventrikuläre Hypertrophie, Septumdicke > 13 mm), Angiographie oder auf Zn. Myektomie. Im Mittel ergab dies:

	MW \pm SD
Sept. (mm)	18,7 \pm 4,5
HW (mm)	13,4 \pm 4,2
Sept./HW	1,4 \pm 0,4
LVEDD (mm)	47,2 \pm 6,5
LVESD (mm)	28,5 \pm 7,6

Es waren nicht alle Patienten orthograd schallbar (4/63), so dass der Mittelwert (MW) \pm Standardabweichung (SD) nicht das gesamte Kollektiv erfasst.

Im einzelnen wurde die Erst-Diagnose bei den Patienten gestellt durch:

Echo	20
HK	27
HK/Echo	1
durch Familienanamnese	1
im einzelnen nicht bekannt	14

Des Weiteren erfolgte die Unterteilung in:

11 Patienten mit HOcm, 7 Probanden gaben anamnestisch eine Myektomie und 15 eine Biopsie an, 38 hatten einen Herzkatheter erhalten, 11 hatten einen Schrittmacher (SM oder AICD) implantiert bekommen. Bei 4 unverwandten Patienten bestand eine positive Familienanamnese. 2 Patienten waren bei der Fertigstellung der Arbeit 1998 bereits verstorben (I. 1996, Apoplex; II. 1997, unbekannt). Zu den häufigsten Nebendiagnosen zählten

Hypertonie, Niereninsuffizienz, Diabetes mellitus, Fettstoffwechselstörung und chronisch obstruktive Lungenerkrankung.

Symptome waren unter anderem (in %):

Dyspnoe	49,21
Angina pectoris	31,75
Palpitationen	12,69
Schwindel/Synkope	23,81
Rhythmusstörungen (VES, AF, VT)	44,44

2.2.3. Definieren der Vergleichskollektive

Als Kontrollgruppe wurden für die Arbeit zusätzlich 48 Patienten des gleichen Krankenhauses mit dilatativer Kardiomyopathie (DCM) und 46 Blutspender aus der Blutbank des Universitätsklinikums Rudolph Virchow der Humboldt-Universität zu Berlin nach dem Zufallsprinzip ausgewählt. Die DCM-Kontrollgruppe wurde bereits als Kollektiv in einer zuvor fertiggestellten Promotionsarbeit von Frau M. Heidenreich klinisch erfasst.

Die Patienten mit DCM setzten sich aus 38 männlichen und 10 weiblichen Probanden zusammen. Das Alter in Jahren zum Zeitpunkt der Genotypisierung war im Mittel $54,3 \pm 8,9$. In der Kontrollgruppe aus der Blutbank befanden sich 19 Frauen und 27 Männer im Alter im Mittel ebenfalls zum Zeitpunkt der Untersuchung von $36,2 \pm 11,4$. Weitere klinische Angaben zu diesen Proben kann aus datenschutzrechtlichen Gründen nicht gemacht werden.

2.2.4. Gewinnung und Präparation menschlicher genomischer DNA

Alle teilnehmenden Probanden gaben ihr Einverständnis zur Entnahme von ca. 5-20 ml EDTA Blut aus einer peripheren Vene. Aus den Leukozyten dieser Proben konnte aus frischem oder eingefrorenem Blut die hochmolekulare, menschliche DNA gewonnen werden [Miller et al.

(1988)]. Durch spektrometrische Messung bei 260 und 280 nm erfolgte die Bestimmung der Reinheit und Konzentration der isolierten DNA.

Die DNA Isolation wurde standardmäßig nach einer Aussalzmethode von Miller durchgeführt (Protokoll für 5 ml Frischblut):

1. 5ml EDTA antikoaguliertes Frischblut mit 15 ml Frischlysispuffers (155 mM NH_4Cl + 10 mM KHCO_3 + 0,1 mM EDTA) versetzen und für 10 min auf Eis lysieren
 2. Abzentrifugieren der Leukozyten als Pellet für 15 min mit 1500 rpm bei 4°C
 3. Resuspension des entstandenen Leukozytenpellets mit Kernlysispuffer (10 mM Tris-HCl + 400 mM NaCl + 2 mM EDTA), Zugabe von 30ml SDS 10% und 200µl Pronase E und Inkubation über Nacht bei 37°C im Inkubator
 4. Ausfällen der Proteine mittels 1,6 ml gesättigtem NaCl (6M), kräftig schütteln und mit 2500 rpm zentrifugieren
 5. Überstand mit der aus den Kernen freigesetzten DNA in ein neues Falconröhrchen übertragen und mit 1 Vol. Isopropanol versetzen
 6. präzipitierte DNA mit einem Glashaken fischen und in 70%igem Ethanol reinigen
 7. Lösen der DNA in 400 µl TE-Puffer (10 mM Tris + 1mM EDTA)
 8. Photometrische Messung der Konzentration und Reinheit der in TE-Puffer gelösten DNA gegen eine Leerprobe bei 260 nm und 280 nm Wellenlänge
-

Für die anschließende PCR-Analyse wurden Aliquots mit einer Endkonzentration von 20 ng/ml hergestellt und im Kühlschrank gelagert. Die jeweiligen DNA-Stocklösungen mit fortlaufender DNA-Nummer wurden bei -20°C tiefgefroren.

2.2.5. Molekulargenetische Methoden bei der Mutationssuche im *TNNT2*

2.2.5.1. Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR, engl. „polymerase chain reaction“) nach Mullis et al. (1986), beruht auf der in vitro Synthese von bekannten DNA-Sequenzen an einer

Einzelstrangmatrix, die zwischen zwei vorgegebenen Oligonukleotidprimern liegt. In einer Hybridisierungsreaktion („Annealing“) werden diese Primer an den gewünschten Nukleinsäureeinzelstrang im 5'-Terminus gebunden [Weaver (1997), Hennig (1998)]. Mittels einer thermostabilen DNA-Polymerase [*Taq* (Thermus aquaticus)-DNA-Polymerase] werden dann die beiden Stränge in Richtung auf das 3'-Ende abgelesen und neu synthetisiert. Durch Verwendung eines PCR-Standardansatzes mit thermostabiler DNA-Polymerase kann auf einfache Weise die Durchführung wiederholter DNA-Synthese- und Renaturierungszyklen erfolgen [Saiki et al. (1988), Orita et al. (1989)].

Mit Hilfe des Computerprogrammes ‚Primer‘ (Version 5.0) konnten aus dem Vergleich der Sequenzen für das kardiale Troponin T Gen von L. Thierfelder in Anlehnung an das kardiale Troponin T Gen der Ratte Primer für die PCR-Analyse festgelegt werden [Jin et al. (1992), K. Schwartz, Mesnard et al. (1993) und Farza et al. (1994)]. Auswahlkriterien für die Wahl eines Primers waren ein GC-Gehalt zwischen 40-60 %, eine Schmelztemperatur von 56-69°C, eine geringe Sekundärstrukturbildung und 3'-Selbst-Komplementarität. Die einzelnen Primer sollten eine Länge von 18-21 Nukleotiden nicht überschreiten. Ihre Lage wurde jeweils im 5'- und 3'-des nicht kodierenden Bereiches (Intron) der zu amplifizierenden proteincodierenden DNA-Teilsequenz (Exon) des kardialen Troponin T Gens gewählt, dieses gewährleistete eine vollständige Untersuchung der möglichen Varianten im Exon-Bereich und des eingeschlossenen Intron-Abschnittes. Der Vorwärts-Primer (F) umfasst die Sequenz komplementär am 5'-Ende und der Rückwärts-Primer (R) komplementär zum 3'-Ende. Die zu amplifizierende Fragmentgröße sollte 150-300 Bp betragen, um im optimalen Sensitivitätsbereich der PCR-SSCP-Analyse zu liegen [Grompe (1993), Hayashi et al. (1993)]. Durch die Firmen Applied Biosystems (Weiterstadt), Invitek GmbH (Berlin) und BioTeZ Berlin-Buch GmbH wurden die Primer gebrauchsfertig synthetisiert. Nach Erhalt eines optimalen PCR-Ergebnisses konnten die einzelnen Eigenschaften wie Fragmentgröße des amplifizierten Produktes, die jeweilige Annealingtemperatur und mögliche Zusätze festgelegt werden. Die einzelnen Charakteristika sind in der nachfolgenden Tabelle 2 aufgeführt.

Oligonukleotid	Oligonukleotid-Sequenz		Primerlänge (nt)	Fragmentgröße (nt)	GC-Anteil (%)	Annealing-Temperatur (°C)	Zusatz	
ctntex 2 F neu	5′	TTCTGAGGAAGGCAGGCTTC	-3′	20	144	51	58	
ctntex 2 R	5′	CCCCACTCAGGCAAGATC	-3′	18				
ctntex 34 F	5′	ATGTGCTGTGTGCGAGCTAC	-3′	20	261	53	60	
ctntex 34 R	5′	GACAGATGAGCTGCTTTCCC	-3′	20				
ctntex 5 F	5′	TGGTTCGCTGATAGCATG	-3′	20	236	59	62	
ctntex 5 R	5′	GTCAGGTGCACATGGGAAG	-3′	19				
ctntex 6 F	5′	CAGGGGAATGTGTGTGTGAG	-3′	20	268	51	62	
ctntex 6 R	5′	TGTGGGATTCTCCTCCAAAG	-3′	20				
ctntex 7 F	5′	ATGGGGAAATGGAAATCCAC	-3′	20	180	59	54	
ctntex 7 R	5′	CTCTCTAGGCCTCTGCTCC	-3′	20				
ctntex 8 F neu	5′	TGCCATTGTTGACGTCAG	-3′	18	240	55	59	
ctntex 8 R neu	5′	GGCCTACTCAACCCACAG	-3′	18				
ctntex 9 F b	5′	GTGTCTAGCCCACCCATCTC	-3′	20	241	56	62	
ctntex 9 R	5′	TGAGACAGACTGGCCATCAG	-3′	20				
ctntex 11 F S	5′	GGAGGCCGGGCACCATTG	-3′	18	244	62	68	
ctntex 10 R S	5′	ATGGGCCTGGGCTAGGGG	-3′	18				
ctntex 11 F	5′	CAATCCTTCCCCTAATTGTC	-3′	21	227	53	60	
ctntex 11 b R	5′	CTGCAGTGGACACCTCATTC	-3′	20				
ctntex 12 F	5′	CTCTTCCATGTCTCTCCTTGC	-3′	21	150	52	54	3 % DMSO
ctntex 12 R	5′	GGGGAGGAAGAAGGCTTGAC	-3′	20				
ctntex 13 F	5′	GTGGCAGTTTACTCTGCTTCC	-3′	21	232	59	60	
ctntex 13 R b	5′	TGGTGGCTCACAGCAAGAAG	-3′	20				
ctntex 14 F neu	5′	AGGGCCCTTTCTTACTGGAC	-3′	20	191	58	60	
ctntex 14 R	5′	CCAGGAGGAGTGTGAGATGG	-3′	20				
ctntex 15 F	5′	TGCACTACCCCTTCTC	-3′	18	195	53	60	
ctntex 15 R	5′	CTGGAAGGTAGGGAAGGAGG	-3′	20				
ctntex 16 F	5′	CCATGTCACTGCGTCCTG	-3′	18	188	65	60	
ctntex 16 R	5′	CCCATTTCCAAACAGGAG	-3′	19				

Tab. 2: Primerpaare für die SSCP-Analyse im kardialen Troponin T Gen.

Bei den Primern cntex 2 F/R bis cntex 8 Fn/Rn sowie die Primer cntex 12 F/R, cntex 15 F/R und cntex 16 F/R konnte eine direkte Synthese aus der Sequenz von L. Thierfelder erfolgen. Das Primerpaar cntex 9 F b/R konnte erst optimiert werden, nachdem die Sequenz um Exon 9 im Intron-Bereich mit der Sequenz von Farza verglichen und korrigiert wurde. Für die Synthese des Primerpaares für das Exon 10 wurde die Oligonukleotid-Sequenz von K. Schwartz benutzt. Dies ergab zuerst ein Primerpaar cntex 11 F S/R S mit einer Fragmentlänge von 343 Bp, die für die anschließende SSCP-Analyse zu groß war. Eine Verkürzung auf 244 Bp ermöglichte eine Auswertung der Bandenmuster. Die Primerpaare für Exon 11, 13 und 14 wurden durch Kombination des Vorwärts-Primers des jeweilig niedrigeren Exons mit dem Rückwärts-Primer des höheren Exons kombiniert und bei Erhalt eines spezifischen Produktes kloniert und sequenziert (Abb. 1). Die Sequenz wurde dann nochmals mit der Sequenz von L. Thierfelder verglichen. Eventuelle Unterschiede wurden korrigiert und ein neuer Primer bestellt. Im einzelnen bedeutet das, dass für Exon 11 das Primerpaar cntex 11 F/cntex 12 R sowie für Exon 13 und 14 cntex 13 F/cntex 14 R kombiniert wurde.



Abb. 1: PCR-Produkt aus Kombination der Primer von cntex 13 F mit cntex 14 R. Spur 1: Marker. Spur 2-3: spezifisches PCR-Produkt. Spur 4: H₂O-Kontrolle.

In der Primer-Optimierung wurde jedes Primerpaar in einem PCR-Standardansatz mit den anderen Reagentien vermischt. Ein Ansatz beinhaltete folgende Zusätze in einem Gesamtvolumen von 25 μl :

2,5	μl	PCR-Puffer (1M KCL, 1M Tris-HCL, 1M MgCl_2 , 0,5 g Gelatine)
4,0	μl	1 dNTPs (je 200 μM)
0,2	μl	<i>Taq</i> -Polymerase (5 U/ μl)
3,0	μl	DNA (20 ng/ml)
~	μl	Primer F *
~	μl	Primer R *
~	μl	Aqua inject. (x μl ad 25 μl GV)
25	μl	Gesamtvolumen

* je nach Primer 0,4-1 μl [5/10 pmol/ μl]

Im Thermozykler Perkin Elmer Gene Amp 9600 erfolgte die standardisierte PCR-Reaktion:

I.	5 min	94°C	initiale Denaturierung des DNA-Doppelstranges	} 35 Zyklen
II.	20 sec	94°C	initiale Denaturierung des DNA- Doppelstranges	
	20 sec	siehe Tabelle	Hybridisierung der Primer („Annealing“)	
	20 sec	72°C	Synthese des komplementären DNA-Stranges durch die DNA-Polymerase („Extension“)	
III:	5 min	72°C	finaler Verlängerungsschritt	
IV.	∞	4°C	Kühlung	

Für die PCR-Optimierung wurde der PCR-Standardansatz nur in der Menge des Primerzusatzes und in der Annealing-Temperatur variiert. Einige Primer ergaben schon mit 5 pmole/ μ l ein optimales Ergebnis.

Das Primerpaar cntex 12 F/R ließ sich nicht mit der oben genannten Vorgehensweise amplifizieren. Der Zusatz von 3% DMSO bewirkte den Erhalt des spezifischen Fragmentes. Zusätzlich zur Hitzedenaturierung führt die Zugabe von organischen Reagentien wie DMSO oder Formamid zu einer Unterbrechung der Wasserstoffbrückenbindungen des DNA-Doppelstranges. Dies erleichtert die folgende Primerhybridisierung [Weaver (1997)].

2.2.5.2. Agarose-Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese ist eine Methode bei der geladene Moleküle aufgrund ihrer unterschiedlichen Nettoladung in einem elektrischen Feld wandern. Die Wanderung erfolgt in einem in einer Pufferlösung angesetztem Agarosegel, wobei das zu trennende Material und ggf. ein geeigneter Marker auf eine Startlinie aufgetragen werden. Durch „Anfärben“ der Proben durch chemische Verbindungen wie Psoralen oder Ethidiumbromid, welche mit den Basenpaaren der DNA interkalieren, kann das Ergebnis mittels eines Transluminators unter UV-Licht sichtbar gemacht und dokumentiert werden [Hennig (1998), Buddecke (1989)].

Nach jeder Polymerase-Kettenreaktion wurden ca. 3-5 μ l des PCR-Gesamtvolumens, je nach Art und Größe der verwendeten Elektrophoresekammer, und die entsprechende Menge Aqua inject. als Leerwertkontrolle, mit 2-5 μ l Agaroselaufpuffer [5fach TBE, 20% Ficoll[®] 400, Bromphenolblau (0,1%ige Lsg.), Aqua ad inject.] vermischt. Ein Teil des Ansatzes wurde dann auf ein 1%iges Agarosegel mit 2,5-20 μ l Ethidiumbromid (10 mg/ μ l) aufgetragen und horizontal elektrophoretisch in 1fach TBE-Puffer [0,1M Tris Base, 0,1M Borsäure, 0,002M Tritriplex III] aufgetrennt. Durch Hinzufügen einer 100 Bp-Leiter und der Leerwertspur konnte das Ergebnis der PCR-Reaktion mittels eines Transluminators unter UV-Licht auf Qualität und amplifizierte PCR-Menge überprüft werden. Die Dokumentation erfolgte fotografisch.

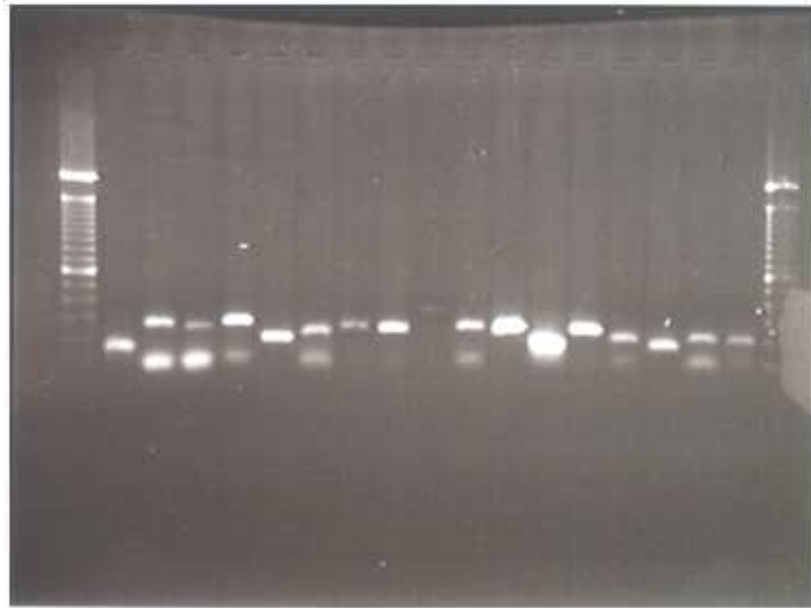


Abb. 2: Exemplarisches Gelbild verschiedener *TNNT2*-PCR-Produkte aufgetragen gegen einen 100 Bp-Marker (äußere Spuren).

2.2.5.3. Einzelstrang-Konformationsanalyse

Eine einfache, kostengünstige und schnelle Möglichkeit Punktmutationen und Polymorphismen in der genomischen DNA einzelner Patienten zu identifizieren bietet die Gelelektrophorese von Einzelstrang-DNA unter nicht-denaturierenden Gelbedingungen [Einzelstrang-Konformationsanalyse, engl. Single-strand conformation polymorphism- (SSCP)-analysis von Orita et al. (1989)]. Durch Hitzedenaturierung wird das durch PCR-Technik gewonnene Amplifikat in zwei Einzelstränge geteilt. Durch die Zusammensetzung des Gels, die Größe der Gelporen, die Umgebungstemperatur und den Salzgehalt des Ladepuffers formen die Einzelstränge unterschiedliche Sekundärstrukturen, welche spezifisch für die jeweilige Nukleotidsequenz ist. Unterscheiden sich die gebildeten Sekundärstrukturen durch unterschiedliche Basensequenzen wird dadurch ein abweichendes Laufverhalten im angelegten elektrischen Feld bewirkt, welches als verändertes Bandenmuster nach der Silberfärbung des SSCP-Geles sichtbar gemacht werden kann. Eine abschließende Identifikation der Veränderung erfolgt durch Klonierung und Sequenzierung des betreffenden PCR-Amplifikates [Grompe (1993), Orita et al. (1989), Glavac et al. (1993), Budowle et al. (1991), Sanger et al. (1977)].

Die Polyacrylamid (PAA) -Gele bestehend aus Acrylamid:Bisacrylamid im Verhältnis 49:1, auspolymerisiert durch Zugabe von 0,1% TEMED und 0,1% APS als Katalysator, bildeten die nicht-denaturierenden Gelbedingungen für die SSCP-Analyse in dieser Arbeit. Mittels des

Glasplattensystem der Firma Biometra konnten 110x120x1 mm große Gele für die Elektrophoresekammer vom Multi-Long Typ G 47, Biometra hergestellt werden. Pro Gel konnten so insgesamt 23 PCR-Proben und eine Markerspur aufgetragen werden. Die einzelnen Geltaschen wurden mit 4-8 µl Gemisch aus 4 µl PCR-Amplifikat und 6 µl SSCP-Gelladepuffer (1 Volumenanteil Agaroselaufpuffer, 6 Volumenanteile Formamid), welches vorher für 5 min bei 95°C denaturiert und durch sofortiges Kühlen auf Eis am Renaturieren der gebildeten Einzelstränge gehindert wurde, gefüllt.

Zeitgleich wurde jede einzelne Probe bei unterschiedlichen Elektrophoresebedingungen (RT, 60 V und 4°C, 70 V) 13-17 Stunden analysiert. Es wurde 0,5fach TBE (0,05M Tris Base, 0,05M Borsäure, 0,001M Tritriplex III, pH 8) als Elektrophoresepuffer benutzt.

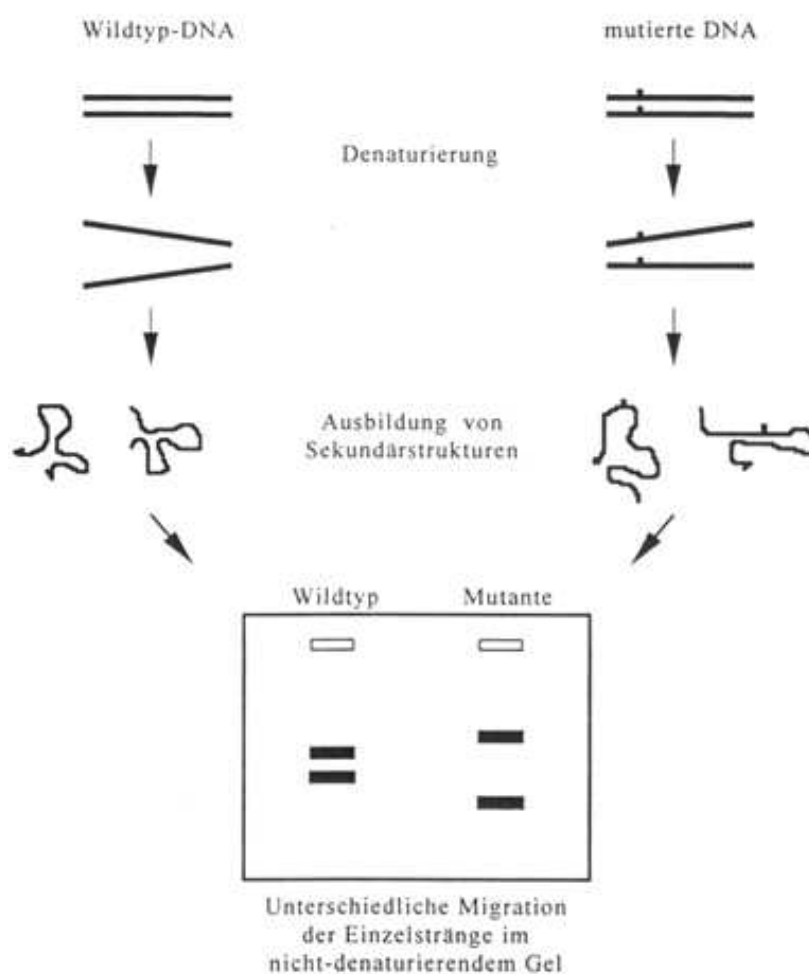


Abb. 3: Darstellung der SSCP-Analyse. Die Basensubstitution ist durch ■ gekennzeichnet. Diese Abweichung bewirkt die unterschiedliche Migration im nicht-denaturierendem Gel (modifiziert nach Grompe).

Wie oben bereits erwähnt, wurden die Gele im Anschluss an die Elektrophorese einer Silberfärbung zugeführt, die nach folgendem Standardprotokoll nach Budowle et al. (1991) durchgeführt wurde:

1.	DNA-Fixierung im Gel	10%iges Ethanol	mind. 5 min.
2.	pH-Wert-Einstellung	1%iger HNO ₃ -Lsg.	mind. 2 min.
3.	DNA-Färbung im Gel	2%ige AgNO ₃ -Lsg und 200 µl Formaldehyd	mind. 30 min.
4.	Entfernen der unspezifisch gebundenen Silberionen durch dreimaliges Waschen mit Aqua dest.		
5.	Entwicklung des Gels	30%ige Na ₂ CO ₃ -Lsg.und 300 µl Formaldehyd	mind. 3mal mit je 200 ml Ansatz
6.	Fixierung des Gels	10%ige Essigsäure	mind. 10 min.

Die gefärbten Gele wurden zu Dokumentationszwecken auf einen Whatmann-Filter gelegt, bei 80°C unter einem Vakuumfilter getrocknet und abschließend auf Laufmusteränderungen der DNA-Einzelstränge ausgewertet. Konnten Abweichungen bei einem oder mehreren Patienten ermittelt werden, wurden die PCR-Fragmente dieser Personen einkloniert und sequenziert [Sanger et al. (1977)].

2.2.6. Klonierung von DNA-Fragmenten

Ein Verfahren der Gentechnologie ist die Klonierung, bei der spezielle Zellen fremde DNA-Fragmente enthalten und mit denen vermehrt werden. Die Einschleusung der Fremd-DNA in eine bakteriologische Wirtszelle kann mittels unterschiedlicher Vektoren wie bakterielle Plasmide, Bakteriophagen, Cosmide oder künstliche Hefechromosomen erfolgen.

Durch die Behandlung des Vektors mit speziellen Restriktionsenzymen wird dieser an einer Restriktionsschnittstelle geöffnet und die fremde DNA-Sequenz kann durch Basenpaarung

mittels einer Ligase in das Vektor-Genom ligiert werden. Das Vektor-Genom-DNA-Molekül kann dann in vorbereitete Wirtszellen (kompetente Bakterien) transformiert werden. Nach der Transformation können die Zellen auf geeigneten Nährböden (Agarplatten) ausgesät werden und sich auf diesen vermehren. Man erhält durch diese Methode viele Kolonien des gewünschten DNA-Inserts [Glover (1988), Drlica (1984), Hennig (1998)].

2.2.6.1. Klonierung von Varianten im *TNNT2* mittels Plasmid Vektoren

Für die Klonierungsreaktion wurden die PCR-Amplifikate der jeweiligen Probanden eingesetzt, die in der SSCP-Analyse Laufmusteränderungen gezeigt haben. Es wurden möglichst homozygote (benannt als Allel 11 oder 22) ggf. auch heterozygote Träger (benannt als Allel 12) des gleichen Fragmentes ausgewählt. Das PCR-Produkt wurde mit dem Plasmidvektor pCR[®] 2.1-TOPO aus dem TA TOPO Cloning[®] Kit der Firma Invitrogen ligiert. Alle Schritte der Klonierungsreaktion erfolgten nach den Angaben des Herstellers. Der Ligationsansatz (1 µl pCR[®] 2.1-TOPO Vektor, 0,5-2 µl PCR-Amplifikat ad 2-3,5 µl Aqua ad inject. ad 5 µl Gesamtvolumen) wurde bei Raumtemperatur 5 Minuten inkubiert und für 1 Minute auf Eis gestellt. Für die folgende Hitzeschocktransformation wurden 2 µl des Ligationsansatzes verwendet.

2.2.6.2. Transformation von kompetenten *Escherichia coli* Zellen mit Plasmid-DNA

Die Aufnahme von fremder DNA in ein zelluläres Genom wird als Transformation bezeichnet. Mittels bakterieller Plasmide oder anderer Vektoren kann die Einschleusung des fremden Erbmateriale in eine speziell vorbereitete Bakterienzelle (kompetente Zelle) erfolgen. Nach Einbau der Fremd-DNA in das Genom der Rezeptorzelle kann diese nun vermehrt werden [Hershey (1951), Hanahan (1983)].

Von dem bereitstehenden Ligationsansatzes wurden 2 µl mit auf Eis aufgetauten 50 µl kompetenten *E. coli* Zellen (Genotyp Top 10 von Invitrogen) vorsichtig vermischt. Anschließend erfolgte eine 15 minütige Inkubation auf Eis. Die Effektivität der Aufnahme der Plasmid-DNA in die Prokaryotenzellen wird durch eine Hitzeschockbehandlung (42°C, 45 Sekunden), welche die Zellmembran permeabilisiert, erhöht.

Nach der Zugabe von 250 μ l SOC-Medium (5 g bacto-Yeast Extrakt, 20 g Bacto-Tryptone, 10 ml 250 mM KCL, 0,5 g NaCl, 20 ml 1M Glucoselsg., 5 ml 2M MgCl₂, ad 1l H₂O, pH 7,0) wurde der Ansatz für 30 Minuten bei 37°C auf dem Schüttelinkubator inkubiert. Nach Beendigung der Inkubation wurden 75 μ l des Transformationsansatzes mit 40 μ l X-Gal (5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- β -D-Galactopyranosid), 20 mg/ml (DMF) auf ampicillinhaltigen LB-Agarplatten (100 μ g/ml) gleichmäßig ausplattiert, so dass über Nacht bei 37°C im Brutschrank getrennte Kolonien wachsen konnten.

2.2.6.3. Insert-spezifische Polymerase-Kettenreaktion

Durch die Insert-spezifische Polymerase-Kettenreaktion kann im Anschluss die Spezifität der Klonierung überprüft werden, ob die gezüchteten Bakterienkolonien die Insert-DNA im Plasmid enthalten.

Von den über Nacht gewachsenen Bakterienkolonien wurden ca. 20 Klone mit einer Impföse von der Agarplatte gepickt. Bevor die einzelne Kolonie jeweils in 10 μ l Aqua ad inject. resuspendiert wurde, wurde eine neu beschriftete Agarplatte für die Plasmid-Isolation beimpft und nochmals über Nacht inkubiert. Das Resuspendat wurde zum Auflösen der Bakterienzellwände bei 95°C für 5 Minuten denaturiert. Das Lysat wurde nun als Templat in einem PCR-Standartansatz (s. 2.2.5.1.) amplifiziert. Das Ergebnis der fragmentspezifischen PCR wurde auf einem 1% Agarosegel überprüft und einer SSCP-Analyse unterzogen. Die Auswertung der verschiedenen Laufmuster der einzelnen Klone ergab Aufschluss darüber, welches Allel der gefundenen Mutation inkloniert wurde (s. 2.2.5.3.).

Für die Plasmid-Isolation wurden nun die Kolonien, die das gesuchte Insert enthielten, von der neu über Nacht angesetzten Agarplatte entnommen.

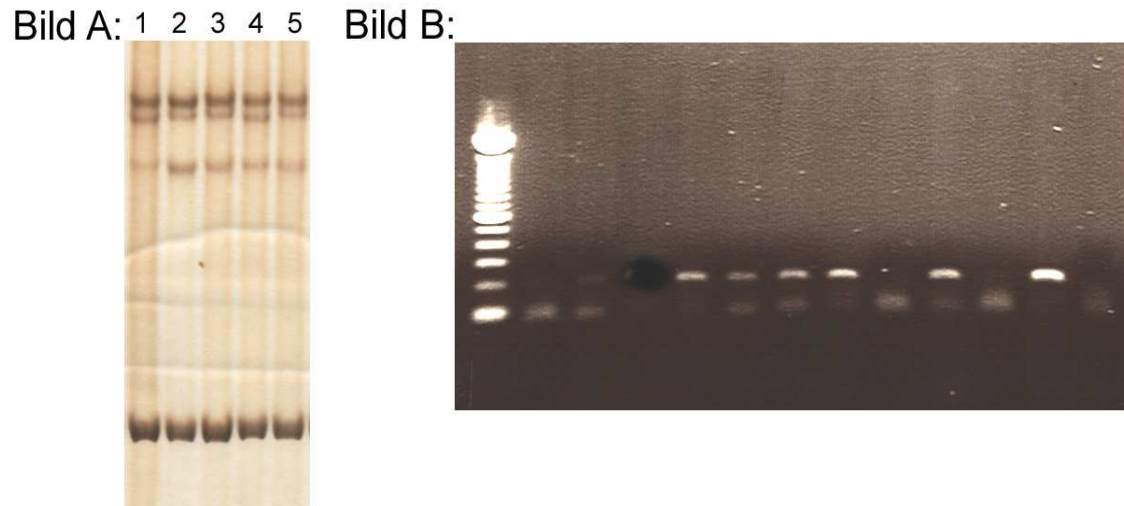


Abb. 4: Bild A: SSCP-Analyse nach Insert-spezifischer-PCR-Amplifikation der Klone von Indexpatient 13 für Exon 16. Spur 1, 3, 4 und 5: Klone für das spätere T-Allel. Spur 2: C-Allel. Bild B: Insert-spezifische-PCR-Analyse der einzelnen Kolonien von Indexpatient 13 für Exon 16 gegen 100 Bp-Marker (linker Bildrand).

2.2.6.4. Isolierung und Aufarbeitung der Plasmid-DNA

Durch die Isolation und die Aufarbeitung der rekombinanten Plasmide kann eine ausreichende Menge mit hoher Reinheit für die Sequenzierung bereit gestellt werden.

Unter sterilen Bedingungen wurden von der LB-Agarplatte mit den vereinzelt Kolonien nur die Insert-spezifischen Klone entnommen und in einem Falconröhrchen mit 5 ml ampicillinhaltigem LB-Medium (100 mg/ml) resuspendiert. Eine Vermehrung der Kolonie erfolgte nun in dem Flüssigmedium über Nacht (37°C, Schüttelinkubator mit 200 rpm). Am folgenden Tag wurde die gewachsene Bakterienkolonie durch Zentrifugation (10 min, 3000 rpm) vom Überstand getrennt. Das gewonnene Bakterienpellet wurde anschließend mit dem Quiagen Plasmid Mini Kit[®] (Quiagen) laut dem Protokoll des Herstellers aufgearbeitet. Durch die Plasmidpräparation werden Bestandteile der Bakterien (Zellorganellen, Genom, etc.) sowie chromosomale und Plasmid-DNA voneinander getrennt. Durch Zugabe von 200 µl Puffer I [100 µg/ml RNase A, 50 mM Tris/HCL, 10 mM EDTA, pH 8,0] und 200 µl Puffer II [200 mM, NaOH, 1% SDS (Natriumdodecylsulfat)] konnten in der 3-4 minütigen Reaktionszeit bei Raumtemperatur die Bakterienwände durch das SDS lysiert, die DNA durch NaOH denaturiert und die freigewordene RNA durch RNase A verdaut werden. Durch Zugabe von 200 µl Puffer III [3 M Kaliumacetat, pH 5,0] und vorsichtiges Schwenken wurde die Lösung neutralisiert und die kleine Plasmid-DNA renaturiert. Alle anderen Bestandteile wie Proteine, Zelldetritus, chromosomale DNA und das SDS wurden hierbei ausgefällt. Durch Zentrifugation (5 min,

14000 rpm) wurde ein klarer Überstand mit der renaturierten Plasmid-DNA gewonnen, der mit dem Anionenaustauscher Quiagen-tip 20[®] aus dem Plasmid Mini Kit[®] aufgereinigt wurde. Die hohe Selektivität des Austauschers bewirkt eine spezifische Bindung der Plasmid-DNA an diesen und somit eine Trennung von den anderen Bestandteilen des Lysats. Durch Zugabe von 500 µl Puffer und 500 µl Puffer W2 und jeweiliges Zentrifugieren (1 min RT, 14000 rpm) wurde sicher gestellt, dass alle unspezifischen Bindungen an den Austauscher unterbunden wurden. Eine Extraktion der Plasmid-DNA erfolgte mittels 30 µl Aqua ad inject. durch abschließendes Zentrifugieren (1 min RT, 14000 rpm). Durch anschließende spektrometrische Messung konnte die Konzentration und Reinheit der DNA bestimmt werden. Für die Sequenzierung wurde eine Menge von 200-250 ng/µl benötigt.

2.2.7. DNA-Sequenzierung

Die Bestimmung der DNA-Sequenzen erfolgte auf einem automatischen Kapillar-Sequencer (ABM Prism[™] 310) mit der Methode Cycle sequencing.

Dabei handelt es sich im Prinzip um die Sanger-Sequenzierung oder die Didesoxy-Sequenzierung. Bei der enzymatischen DNA-Sequenzierung besteht das Prinzip darin, die Synthese des 5'- nach 3'-Stranges des zu sequenzierenden DNA-Abschnittes basenspezifisch abubrechen. Die dadurch entstehenden unterschiedlich langen DNA-Fragmente spiegeln die Position des jeweiligen endständigen Nukleotids wieder. Daraus kann die Basenfolge des untersuchten DNA-Abschnitts ermittelt werden. Bei diesem Verfahren kann einzel- oder doppelsträngige DNA verwendet werden. DNA-Doppelstränge werden zuerst durch Hitzebehandlung denaturiert, anschließend mit einem Primer hybridisiert und mittels einer DNA-Polymerase verlängert. Um einen Kettenabbruch zu erreichen, werden dem PCR-Ansatz neben den üblicherweise verwendeten Desoxynukleosidtriphosphaten (dNTPs) in adäquater Menge Didesoxynukleosidtriphosphate (ddNTPs) zugegeben. Die Elongation bricht ab, wenn ein 2',3'-Didesoxynukleotid eingebaut wird, das in Position 3 ein H-Atom anstelle der üblichen OH-Gruppe enthält; daraus folgt, dass keine Verbindung zum nächsten Nukleotid möglich ist (Abbruch der Nukleotid-Kette).

Das Verhältnis der Desoxynukleotide zu Didesoxynukleotiden wird so gewählt, dass im statistischen Mittel in jedem Reaktionsgemisch an jeder Position ein ddNTP zumindest einmal eingebaut wird. Die vier ddNTPs (ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP) sind jeweils an

Fluoreszenzfarbstoffe gekoppelt, die unterschiedliche Emissions- und Absorptionsspektren besitzen. Die so entstandenen markierten DNA-Fragmente werden entsprechend ihrer Länge in einer Kapillare elektrophoretisch aufgetrennt. Durch einen stationären Laser, der die unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffe der ddNTPs zur Sekundärstrahlung anregt, kann jede Base identifiziert werden. Das entstehende Bandenmuster entspricht der Basenabfolge des DNA-Moleküls. Die ermittelten Daten können zur Auswertung in Form von Kurvendiagrammen (Elektropherogramm) dargestellt werden.

Nach Angaben des Herstellers erfolgte die Sequenzierungsreaktion mittels PRISM™ Ready Reaction DyeDeoxy™ Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) im Thermozykler Perkin Elmer Gene Amp 9600 durchgeführt.

Der Ansatz für die Sequenzierungs-PCR setzte sich wie folgt zusammen:

4	µl	Terminationsmix (dNTPs, ddNTPs, AmpliTaqDNA Polymerase, Puffer)
2	µl	Sequenzierungsprimer (1,6 pmole/µl)
600	ng	Plasmid-DNA
~	µl	Aqua ad inject.
<hr/>		
10	µl	Gesamtvolumen

Bei der Cycle-Sequenzierung wird das zu sequenzierende DNA-Fragment in 25 Zyklen linear nach folgendem PCR-Standardprogramm amplifiziert:

10 sec	96°C	Denaturierung
10 sec	50°C	Primer-Anlagerung
4 min	60°C	Primer-Verlängerung

Nach der Sequenzreaktion wurden die PCR-Produkte gereinigt. Dabei wurden jeweils 10 µl Amplifikat mit 10 µl Aqua dest. einer Säulenreinigung (Sephadex G 50 Fine DNA Grade) untergezogen, um die überschüssigen ddNTPs zu entfernen. Die Didesoxynukleotide würden bei der automatischen Sequenzanalyse auf Grund ihrer Fluoreszenzmarkierung zu einer Verfälschung des Ergebnisse führen. Die Sequenzprobe (10 µl PCR-Ansatz + 10 µl H₂O) wurde auf ein Sephadex-Säulenbett gegeben und 3 min bei 3000g einrotiert.

Anschließend wurden die Proben nach Zugabe von 3 µl Ladepuffer [5 Teile deionisiertes Formamid/1 Teil EDTA (25 mM EDTA + 50 mg/ml Dextran Blau)] bei 90°C für 2 min denaturiert und nach sofortiger Überführung auf Eis zum Sequenzierer transportiert. Die hergestellten DNA-Fragmente wurden danach elektrophoretisch aufgetrennt. Dabei wurde ein Polymer Pop 6 (PE Applied Biosystems) und eine kurze Kapillare (Abstand bis zum Detektor 30 cm) verwendet.

2.2.8. Nachweismethoden zur Genotypisierung der identifizierten Varianten

2.2.8.1. Überblick über die Bestätigungsmethoden

Nach abgeschlossener systematischer Variantensuche mittels PCR-SSCP-Analyse jedes einzelnen Amplifikates des kardialen Troponin T Gens und der Identifizierung der unterschiedlichen Bandenlaufmuster durch die Sequenzierungsmethode nach Sanger konnten für die gefundenen Ergebnisse spezifische Bestätigungsmethoden etabliert werden.

Die PCR-SSCP-Analyse ermöglicht es, ca.70-95 % der Mutationen in einem PCR-Produkt um die 200 Bp zu finden. Die Sensitivität der Methode nimmt mit der Größe des PCR-Amplifikates ab [Grompe (1993)]. Des Weiteren ist dieses eine Methode bei der die Gele per Augenschein nach unterschiedlichem Laufmusterverhalten ausgewertet werden. Dies kann dazu führen, dass Varianten übersehen werden, weil diese sehr nah an einer Bande des Hauptstranges liegen oder durch die PCR-Amplifizierung und der Beladung der Polyacrylamidgele unterschiedliche Stärken der Banden verursacht werden, die zu einer Annahme einer Bandenmusterabweichung führen können. So können falsch-positive Ergebnisse nicht vermieden werden, weil die Methode keine 100%ige Sensitivität garantiert. Dies beachtend wurden bei der Variantensuche mittels PCR-SSCP-Analyse zwei unterschiedliche Elektrophoresebedingungen (RT; 4°C)

gewählt. So kann davon ausgegangen werden, dass der größte Teil der Mutationen in einem Fragment bis zu einer Fragmentlänge von 300 Bp ermittelt wird [Hayashi et al. (1993)].

Durch die Etablierung von geeigneten Bestätigungsmethoden wie Heteroduplexanalyse, RFLP-, ACRS-Assay und Kontrollsequenzierung wurde die Auswertung der PCR-SSCP-Analyse nochmals in allen Fragmenten mit identifizierten Varianten im Probandenkollektiv kontrolliert, um somit die Validität der Ergebnisse zu gewährleisten.

2.2.8.2. Heteroduplexanalyse

Die Heteroduplexanalyse ist eine Methode, bei der ein komplementärer DNA-Doppelstrang (Homoduplex) mit einem nicht-komplementären DNA-Doppelstrang (Heteroduplex) des gleichen Fragmentes, welcher einen Einzelbasenaustausch (mismatch) sowie eine Insertion oder Deletion enthalten kann, elektrophoretisch nebeneinander aufgetrennt wird [White et al. (1992), Dianzani et al. (1993), Nagamine et al. (1989)]. Die Sensitivität beträgt annähernd der SSCP-Analyse und liegt bei Fragmenten kleiner als 300 Bp bei ca. 80% [Grompe (1993)].

Angewendet wurde die Methode um die Insertion [(CTTCT)₁/(CTTCT)₂] im Intron 3 an Position -11 des *TNNT2* zu bestätigen. 4 µl des PCR-Produktes cntex 34 wurde bei 95°C im Thermozykler denaturiert und bei Raumtemperatur langsam abgekühlt. Durch den Denaturierungsschritt wird der DNA-Doppelstrang in zwei Einzelstränge geteilt und kann sich während der Abkühlung wieder aneinander lagern, wobei der Homoduplex sich komplementär bindet und der Heteroduplex eine andere Sekundärstruktur ausbildet, da durch den „mismatch“ keine komplette Hybridisierung erfolgen kann.

Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wurden die denaturierte Probe mit 5 µl Agaroselaufpuffer (s. 2.2.5.2.) versetzt. Auf ein 10%iges Polyacrylamid-Gel (Acrylamid:Bis-Acrylamid 49:1) wurden 6 µl des Gemisches aufgetragen und elektrophoretisch (RT, 120 V, 3-4 Stunden, in 0,5fach TBE) aufgetrennt. Durch die anschließende Silberfärbung (s. 2.2.5.3.) konnten die unterschiedlichen Banden sichtbar gemacht werden.

Die Heteroduplexe wandern auf Grund ihrer veränderten Sekundärstruktur im Bereich des „mismatches“ langsamer durch das Acrylamidgel als die Homoduplexe. So zeigen sich neben

dem Wildtypmuster noch zusätzliche Banden. Eine Auswertung des Heteroduplex-Gels erfolgt wie bei der SSCP-Analyse am unterschiedlichen Bandenmuster (s. Abb. 11, Bild C, S. 46).

2.2.8.3. Restriktionsfragmentlängen-Polymorphismus-Analyse

Die Restriktionsfragmentlängen-Polymorphismus-Analyse (RFLP, engl. restriction fragment length polymorphism) ist eine Technik bei der in homologen Chromosomenregionen DNA-Sequenzunterschiede bestehen, die dazu führen, dass bei einem Restriktionsverdau mittels geeigneter Endonukleasen und anschließender Gelelektrophorese DNA-Fragmente unterschiedlicher Länge entstehen. Im Falle einer Heterozygotie entstehen je nach verwendetem Restriktionsenzym Restriktionsfragmente unterschiedlicher Länge. Handelt es sich um Homozygotie gibt es ein Fragment, wobei dieses einem der beiden Fragmentlängen der heterozygoten Konstitution entspricht. Ein RFLP lässt sich somit als genetischer Marker einer identifizierten Variante in einem Kollektiv verwenden [Nathans et al. (1975), Weaver (1997)].

Nach fragmentspezifischer PCR-SSCP-Analyse und Sequenzierung des Amplifikates konnten in der vorliegenden Arbeit für einige der charakterisierten Varianten passende Restriktionsenzyme für die RFLP-Analyse mit dem Computerprogramm „Husar“ des Deutschen Krebsforschungszentrums Heidelberg (DKFZ) ermittelt werden. Durch das Unterprogramm „Mapsort“ wurde ein Restriktionsverdau nach Eingabe des zu untersuchenden DNA-Abschnittes simuliert. Dadurch konnte eine ideale Endonuklease ausgewählt werden, die durch ihre Erkennungssequenz das PCR-Produkt in geeignete Restriktionsfragmente unterschiedlicher Länge schneidet.

Exon	Restriktionsenzym	Isolationsquelle	Erkennungssequenz und Schnittstelle	Inkubationstemperatur
9	<i>TaqI</i>	Thermus aquaticus YTI	5'...T [∇] CGA...3' 3'...AGC _Δ T...5'	65°C
10	<i>EcoNI</i>	Escherichia coli (NEB 441)	5'...CCTNN [∇] NNNAGG...3' 3'...GGANNN _Δ NNTCC...5'	37°C
15	<i>TspRI</i>	Thermus species R.	5'...NNCAGTGN [∇] ...3' 3'... _Δ NNGTCACNN...5'	65°C
16	<i>BsRI</i>	Bacillus stearothermophilus (NEB 447)	5'...ACTGGN [∇] ...3' 3'...TGAC _Δ CN...5'	65°C
16	<i>SmaI</i>	Serratia marcescens Sb	5'...CCC [∇] GGG...3' 3'...GGG _Δ CCC...5'	30°C

Tab. 3: Restriktionsendonukleasen für die RFLP-Analyse; symbolisieren die Schnittstelle: [∇]_Δ

Nach Bestimmung der spezifischen Endonuklease erfolgte für jedes Fragment eine Restriktionsenzym-Optimierung. Laut Angaben des Herstellers wurde ein Standardansatz [1,5µl spezifischer Puffer, 2,5-10 U/µl Enzym, je nach Enzym 10/20 mg/ml BSA (bovines Serumalbumin), Aqua ad inject. ad 15 µl Gesamtvolumen] Reagenzien hergestellt. Variiert wurden die zugefügte PCR-Produktmenge und die dafür zum Verdau benötigte Menge an Restriktionsenzym. Benötigte ein Enzym für seine Restriktionstätigkeit BSA, so wurde dieses ebenfalls angepasst. Unter Konstanthaltung der Gesamtvolumenmenge, der Inkubationstemperatur und -dauer wurde so ein optimales Ergebnis erreicht, welches mittels Gelelektrophorese auf 10% Polyacrylamid-Gel [Acrylamid:Bisacrylamid 49:1, in 0,5fach TBE, Laufzeit ca. 2h, bei RT, 7 µl Gemisch (15 µl Standardansatz und 5 µl Agaroselaufpuffer)] und mit anschließender Silberfärbung (s. 2.2.5.3.) überprüft wurde.

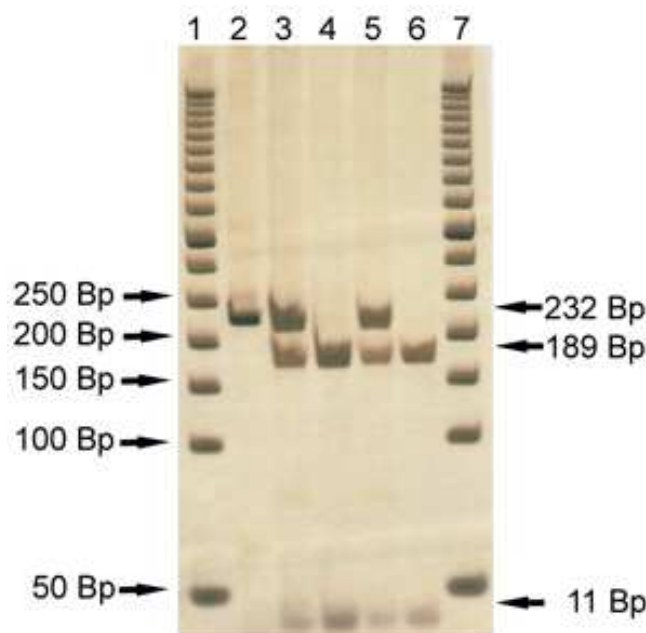


Abb. 5: Optimierungsanalyse für RFLP-Assay *EcoNI* für die Variante IVS9 -97 (CCCCC/CCCC). Spur 1 und 7: 50 Bp-Marker. Spur 2: unverdaute Probe mit 244 Bp-Größe. Spur 3 und 5: heterozygoter Patient. Spur 4 und 6: CCCCC-Allel. Spur 3 und 4: 15 U/µl Enzymmenge. Spur 5 und 6: 7,5 U/µl Enzymmenge.

2.2.8.4. Amplification Created Restriction Site-Assay

Durch das Amplification Created Restriction Site-Assay (ACRS-Assay) erfolgt eine Vermehrung eines bestimmten Gens mittels PCR-Technik. Die Verwendung eines

fehlgepaarten Oligonukleotids („mismatch“-Primer) anstelle eines komplementär bindenden Primers bewirkt eine Veränderung der Amplifikatsequenz an einer definierten Position. Diese Sequenzabweichung kann nun in der RFLP-Analyse als Restriktionsschnittstelle für eine Endonuklease dienen [Halliassos et al. (1989)].

	Wildtyp	Mutante
Template-Allel	5'-...CAGGAGAAGT....-3'	5'-...CAGGAGAGGT....-3'
3'-Ende des „mismatch“- Primers	5'-...CAG <u>A</u> AGA-3'	5'-...CAG <u>A</u> AGA-3'
PCR-Produkt	5'-...CAG <u>A</u> AGAAGT....-3'	5'-...CAG <u>A</u> AGAG _Δ GT....-3'
	keine <i>Eco</i> I Schnittstelle	<i>Eco</i> I Schnittstelle

Abb. 6: Prinzip des ACRS-Assays des Austausches AAG zu AGG an Position 69 im Exon 14. Die unterstrichene Base markiert den „mismatch“, die fettgedruckte die Position der Variante bzw. die Variante und das Symbol Δ die *Eco*I Schnittstelle.

Der „mismatch“-Primer wurde durch Variation der Amplifikatsequenz am 5'-Ende zwei bis vier Basen vor dem Austausch AAG zu AGG an Position 69 im Exon 14 ermittelt. Das fehlgepaarte Oligonukleotid endet mit seinem 3'-Ende eine Basenposition vor der Variante. Dies beeinträchtigt die Synthese eines PCR-Amplifikates durch die *Taq*-Polymerase nicht. Sie kann über den eingebauten „mismatch“ an Position zwei bis vier des Forward-Primers hinweglesen. In der folgenden Tabelle ist das Primerpaar für das ACRS-Assay abgebildet.

Durch das Computerprogramm „HUSAR“ des DKFZ (Tab. 5) konnte analog zur RFLP-Analyse ein geeignetes Restriktionsenzym ausgewählt werden. Der Restriktionsverdau erfolgte wie im Kapitel 2.2.8.3 beschrieben.

Primer	Oligonukleotid-Sequenz	Fragmentgröße	GC-Anteil	Annealingtemperatur
cntex14 FM WT- Sequenz	5'-AGAGAAGTTCGACCTGCAG <u>A</u> AGA-3' * G	153 Bp	58 %	60°C
cntex14 RM	5'-GGGTCCCTGTCCCTATTCCCC-3'			

Tab. 4: Primerpaar für das ACRS-Assay zur Genotypisierung der Variante AAG zu AGG an Position 69 im Exon 14.

Exon	Restriktions-enzym	Isolationsquelle	Erkennungssequenz u. Schnittstelle	Inkubations-temperatur
14	<i>EarI</i>	Enterobacter aerogenes (NEB 450)	5'....CTCTTC(N) ₁3' 3'....GAGAAG(N) ₄5'	37° C

Tab. 5: Restriktionsendonuklease für ACRS-Assay

2.2.8.5. Kontrollsequenzierung einzelner identifizierter Varianten

Die Sequenzierungsreaktion nach Sanger überprüft und definiert die zuvor einklonierte genomische Nukleotidsequenz. Mit dieser Methode lässt sich die aufgetretene Laufmusteränderung im SSCP-Gel genauer bestimmen und durch wiederholtes Sequenzieren bestätigen.

Für die Varianten im Intron 5 (IVS5 -49 G/A), Intron 11 (IVS11 -32 C/A) und den Basenaustausch TCG (Ser)/TCA (Ser) im Exon 8 an Position 4 konnten keine oben genannten Nachweismethoden etabliert werden. Durch wiederholtes Amplifizieren der einzelnen Fragmente nach PCR-Standardprotokoll wurde das PCR-Produkt einkloniert und sequenziert (s. 2.2.6. -2.2.7.). Der Vergleich der Sequenzierungsergebnisse mit den bekannten Gensequenzen für die jeweiligen Fragmente bestätigte die Korrektheit der ermittelten Varianten.

2.3. Statistische Parameter

2.3.1. Bestimmung der Allel- und Genotypverteilung nach dem Hardy-Weinberg-Gesetz

Allele sind bestimmte Ausführungen eines Gens, die in homologen Chromosomen an homologen Genorten (loci) lokalisiert sind. In diploiden Individuen sind jeweils zwei Allele desselben Gens vorhanden, diese können identisch oder verschieden sein. Die genetische Konstitution (Genotyp) eines Organismus wird als homozygot bezeichnet, wenn die beiden Allele gleich sind, wobei sie homozygot für unterschiedliche Allele sein können. Weichen 2 Allele an einem Locus voneinander ab, handelt es sich um einen heterozygoten Merkmalsträger. Die Ausprägung eines bestimmten Gens wird, die Gesamtheit der sichtbaren Merkmale eines Organismus, dagegen als Phänotyp bezeichnet.

Unabhängig voneinander erkannten die Wissenschaftler Hardy und Weinberg 1908, dass bestimmte Regeln für die qualitative und quantitative Verteilung von Allelen unter Individuen einer Population zwischen aufeinanderfolgenden Generationen von Organismen bestehen. Für eine solche Mendel-Population gelten die Mendelschen Regeln, Diploidie, Panmixie (zufällige Fortpflanzung innerhalb einer Population), die genügend große Population (verhindert zufällige Verteilungsabweichungen) und der Ausschluss von Selektion und Migration. Nach Hardy und Weinberg lässt sich für die Allelenfrequenz, die Häufigkeit mit der zwei Allele innerhalb einer Population an einem Locus vertreten sind, eine Beziehung ableiten. Für die Allele p und q in einer Population gilt:

$$p + q = 1 \text{ (100\%)}$$

Daraus ergibt sich, dass die Frequenz eines Allels zwischen 0 und 1 schwankt. Homozygotie innerhalb einer Population liegt vor, wenn die Frequenz eines Allels 1 ist. Trägt kein Mitglied der Gruppe dieses Allel, so ist die Häufigkeit 0.

Die Häufigkeitsverteilung dieser Allele in einer Population, die den oben genannten Kriterien entspricht, lässt sich wie folgt beschreiben:

$$p^2 + 2pq + q^2 = 1 \text{ (Hardy-Weinberg-Formel)}$$

Es ergibt sich für Homozygote der Konstitution pp die Häufigkeit $p \times p = p^2$, der heterozygote Genotyp pq setzt sich zusammen aus $(p \times q) + (p \times q) = 2pq$ und die homozygote Allelenverteilung qq entspricht $q \times q = q^2$. Daraus kann man die Häufigkeit der Genotypen berechnen.

In der vorliegenden Arbeit wurden nach der PCR-SSCP-Analyse die einzelnen Acrylamidgele wie folgt ausgewertet. Zeigten sich im untersuchten Probandenkollektiv keine Laufmusteränderungen, so wurde dieses mit Wildtyp-Allel (WT) bezeichnet. Wurden Abweichungen festgestellt, wurde das Allel mit der höheren Verteilung an diesem Genlocus mit 1 und das andere mit 2 bezeichnet (arbeitsgruppenspezifische Benennung). Ergab sich aus der Kombination der Laufmusterabweichungen von Allel 1 und Allel 2 eine bis dahin noch nicht benannte Allelvariante, so wurde diese mit 12 klassifiziert.

DNA-Nr.	SSCP-Ex2		SSCP-Ex34	
	RT	4°C	RT	4°C
3	WT	WT	12	12
6	WT	WT	12	12
7	WT	WT	12	12
8	WT	WT	22	22
9	WT	WT	12	12
13	WT	WT	12	12
14	WT	WT	22	22
15	WT	WT	11	11
18	WT	WT	22	22
20	WT	WT	22	22
22	WT	WT	22	22
25	WT	WT	11	11

Tab. 6: Auswertung der SSCP-Gele von Exon 2 und Exon 34 bei Raumtemperatur (RT) und 4°C

In dieser Arbeit wurden die einzelnen Varianten auf ihre Übereinstimmung mit dem Hardy-Weinberg-Gesetz hin überprüft. Das heißt, es wurde die erwarteten Genotypenverteilung mit Hilfe des Hardy-Weinberg-Gesetzes errechnet und der beobachteten Genotypenverteilung gegenübergestellt. Es wurde geprüft, ob die beobachteten Werte im Hardy-Weinberg-Equilibrium liegen. Die Übereinstimmung der beobachteten und der erwarteten Werte wurde mittels χ^2 -Tests auf signifikante Abweichungen hin geprüft.

2.3.2. χ^2 -Wert

Der χ^2 -Test wird benutzt, um die Wahrscheinlichkeit zu ermitteln, ob ein experimentell beobachtetes Ergebnis (B), dem angenommenem Mittelwert (E) einer normierten Zufallsverteilung, gleichsteht.

Testwert: $\Sigma (E-B)^2 / E$

Mit dem χ^2 -Test kann eine statistische Aussage über die Signifikanz der Abweichung der beobachteten von der erwarteten Genotypenhäufigkeit gemacht werden. Es findet somit eine Überprüfung statt, ob in einer Population eine Normalverteilung der Genotypen nachdem Mendelschen Gesetz besteht.

Die Anzahl der Freiheitsgrade muss berücksichtigt werden, wenn mehrere zusammenhängende Werte auf ihre Signifikanz hin kontrolliert werden sollen. Wobei die Anzahl der Freiheitsgrade f immer kleiner als die Gesamtzahl der Beobachtungsmöglichkeiten n ist.

Freiheitsgrad: $f = n - 1$

In Statistiktabelle kann nun eine Korrelation zwischen dem Freiheitsgrad f , dem χ^2 -Wert und der Wahrscheinlichkeit p erfolgen. Signifikant ist $p \geq 0,05$, das heißt, Werte in diesem Bereich sprechen mit großer Wahrscheinlichkeit dafür, dass die Genotypen dieser Population dem Hardy-Weinberg-Gleichgewicht entsprechen.

3. Ergebnisse

3.1. Mutationen und Polymorphismen im kardialen Troponin T Gen

Bei 63 konsekutiven, nicht verwandten Patienten mit hypertropher Kardiomyopathie wurde ein systematisches Mutationsscreening im *TNNT2*-Gen Exon 2-16 incl. Exon-Intron-Grenzen (s. 2.1.5.) mittels PCR-SSCP-Analyse auf Polyacrylamid-Gelen in den Jahren 1996-1998 durchgeführt. Ergaben sich genetische Varianten, wurden diese kloniert, sequenziert und mit einer unabhängigen Nachweismethode (s. 2.2.8.ff) bestätigt. Zusätzlich wurden dann 48 Personen mit dilatativer Kardiomyopathie und 46 Personen eines Normalkollektivs auf die identifizierte Variante hin untersucht. Wir konnten insgesamt 11 genetische Varianten identifizieren.

Es fanden sich zwei Mutationen, die jeweils eine Aminosäuresubstitution (Arg278Pro, Lys253Arg) zur Folge hatten. Andere Mutationen im Kodon 278 wurden in der damaligen Literatur bereits als krankheitsverursachend für HCM beschrieben [Watkins et al. (1995)]. Kein anderer Proband aus dem Gesamtkollektiv wies diese Mutation auf. Die anschließende Familienuntersuchung bei diesem Patienten ergab, dass zwei von den drei untersuchten Kindern ebenfalls positiv für diese Mutation sind. Die Mutation Lys253Arg konnte bei insgesamt 3 Probanden ermittelt werden. Dabei handelt es sich um zwei unverwandte Personen aus dem DCM Kollektiv sowie um eine Person aus dem Normalkollektiv. Es erfolgt durch den AS-Austausch keine Ladungsänderung. Eine Mutation an dieser Position ist in der Literatur vorher nicht erwähnt worden.

Die anderen identifizierten Varianten waren zwei Einzelbasenaustausche im Exon ohne AS-Austausch (Ser69Ser, Ile106Ile), eine 1-Bp Deletion [IVS9 -97 (CCCC/CCCC)], vier Einzelbasensubstitutionen im Intron [IVS3 -11 (CTTCT)₁/(CTTCT)₂, IVS5 -49 G/A, IVS11 -32 A/C, IVS14 -33 T/C] und zwei 3'UTR-Einzelbasenaustausche (+6 C/T 3'UTR, +67 G/A 3'UTR) (s. Tab. 7). Die Lokalisation der identifizierten genetischen Varianten ist in der schematischen Übersichtszeichnung (Abb. 7) dargestellt.

Fragment	Variante	HCM-Pat. (n=63)	DCM-Pat. (n=48)	Kontrollen (n=46)	Bestätigung
Exon 1	Startkodon im Exon 2				
Exon 2	keine	Wildtyp	Wildtyp	Wildtyp	
Exon 34	IVS3 -11 (CTTCT) ₁ /(CTTCT) ₂	63,49%/36,51%	56,25%/43,75%	63,04%/36,96%	Heteroduplex
Exon 5	keine	Wildtyp	Wildtyp	Wildtyp	
Exon 6	IVS5 -49 G/A	56,35%/43,65%	52,08%/47,92%	51,09%/48,91%	Kontrollsequenzierung
Exon 7	keine	Wildtyp	Wildtyp	Wildtyp	
Exon 8	Ser69Ser (G207A)	87,30%/12,69%	94,79%/5,20%	94,56%/5,43%	Kontrollsequenzierung
Exon 9	Ile106Ile (T318C)	70,63%/29,37%	68,75%/31,25%	72,83%/27,17%	RFLP mit <i>TaqI</i>
Exon 10	IVS9 -97 Deletion CCCCC/CCCC	98,41%/1,59%	100%/0%	97,83%/2,2%	RFLP mit <i>EcoNI</i>
Exon 11	keine	Wildtyp	Wildtyp	Wildtyp	
Exon 12	IVS11 -32 C/A	68,25%/31,75%	67,71%/32,29%	72,82%/27,18%	Kontrollsequenzierung
Exon 13	keine	Wildtyp	Wildtyp	Wildtyp	
Exon 14	Lys253Arg (A758G)	Wildtyp	Mutante	Mutante	ACRS-Assay mit <i>EarI</i>
Exon 15	IVS14 -33 T/C	93,69%/6,35%	86,46%/13,54%	93,48%/15,22%	RFLP mit <i>TspRI</i>
Exon 16	Arg278Pro (G833C)	Mutante	Wildtyp	Wildtyp	RFLP mit <i>SmaI</i>
Exon 16	+6 C/T in 3'UTR	99,21%/0,79%	97,92%/2,09%	97,83%/2,17%	RFLP mit <i>SmaI</i>
Exon 16	+67 G/A in 3'UTR	97,62%/2,34%	98,96%/1,04%	98,91%/1,09%	RFLP mit <i>BsRI</i>

Tab. 7: Zusammenfassung der identifizierten Varianten im *TNNT2* bei Patienten mit HCM, DCM und der Kontrollgruppe. Die Allelfrequenzen sind in Prozent angegeben.

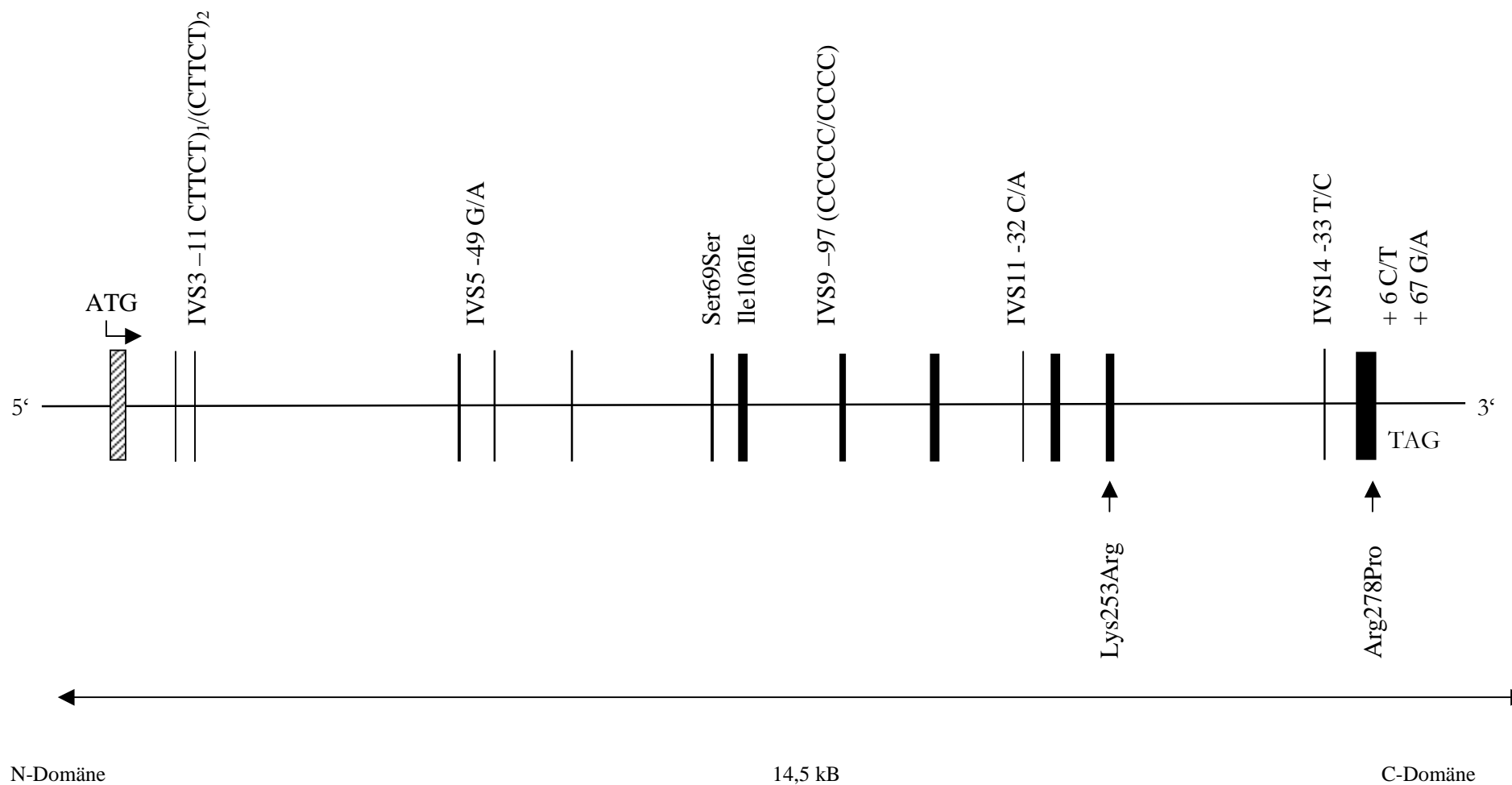


Abb. 7: Lokalisation der identifizierten Ergebnisse im *TNNT2* Exon 2-16 [modifiziert nach Thierfelder et al. (1998)]. Die ausgefüllten Kästen bezeichnen die Exon-Abschnitte; Zählweise nach der kardialen Troponin T Sequenz der Ratte [Jin et al. (1992)]. Der gestrichelte Kasten gibt die unbekannte 5'-Grenze für Exon 2 an. Das Startkodon liegt im Exon 2. Im Exon 16 befindet sich das Stopkodon TAG.

Im Folgenden werden die einzelnen Varianten dargestellt. Die Veränderung der Gensequenz, die Methodik der Genotypisierung, die Häufigkeitsverteilung der detektierten Varianten in den drei Kollektiven und das erwartete Auftreten nach der Hardy-Weinberg-Formel wird beschrieben.

3.1.1. Mutation Arg278Pro (CGC/CCC) (G833C)

Im Exon 16 des *TNNT2* konnte eine bislang nicht beschriebene Mutation bei einem Patienten mit hypertropher Kardiomyopathie ermittelt werden. Sie ließ sich sowohl bei Raumtemperatur und 4°C in der SSCP-Analyse nachweisen (Abb. 10, Bild A). Durch Klonierung des aberranten PCR-Produktes (s. 2.2.6.) und anschließende DNA-Sequenzierung wurde eine G→C Transition an Position 12 im Exon 16 (G833C) nachgewiesen (Abb. 10, Bild D). Aufgrund dieser Substitution kommt es zu einem Aminosäureaustausch der positiven Aminosäure Arginin (CGC) zu der neutralen AS Prolin (CCC) im Kodon 278. Da die Variante im Bereich der Erkennungssequenz der Restriktionsendonuklease *SmaI* liegt, konnte zur Bestätigung eine RFLP-Analyse angewandt werden. Bei der Amplifikation der genomischen DNA mit dem Primerpaar cntex 16 F/R entsteht ein 189 Bp großes PCR-Fragment. Unabhängig vom Vorhandensein der Substitution ergibt sich nach *SmaI*-Verdau immer ein 44 Bp großes Fragment. Der Patient mit der Laufmusterabweichung im SSCP-Gel wies noch Banden der Größe 147 Bp, 104 Bp und 43 Bp auf. Bei Personen, die homozygot für das G-Allel sind, zeigte sich zusätzlich noch ein 147 Bp-Fragment. Wie in der SSCP-Analyse bereits ausgewertet, war kein Proband homozygot für das C-Allel (Abb. 10, Bild B).

Phänotypisch wies der Patient eine typische hypertrophe obstruktive Kardiomyopathie (HOCM) auf (Diagnose: Herzkatheter 1987). Echokardiographisch stellte sich ein interventrikulärer Septumdurchmesser von 24 mm, eine Hinterwanddicke mit 11 mm (Sept./HW.: 2,18) und ein Gradient von 28 mmHg heraus. Im November 1995 erhielt er einen AICD bei spontaner monomorpher nicht-anhaltender ventrikulärer Tachykardie. Anamnestisch bestand kein Anhalt für: arteriellen Hypertonus, HLP oder Diabetes mellitus.

Es bestand die Möglichkeit, einige Familienmitglieder zu untersuchen. So konnte die Variante Arg278Pro bei zwei Töchtern des Patienten nachgewiesen werden. Der ebenfalls untersuchte Sohn war negativ. Auf Grund der griechischen Herkunft der Familie und des nur sehr kurzen Aufenthaltes der Kinder in Deutschland ergab sich nicht die Möglichkeit einer intensiven kardiologischen Diagnostik

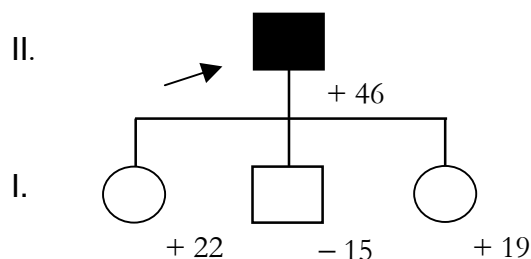


Abb. 8: Stammbaum der Familie des Indexpatienten DNA-Nr 100 (II/1). Kreis, weiblich; Quadrat, männlich; ausgefülltes Symbol, HCM-Phänotyp; +, Mutationsträger; -, genotypisiert, aber kein Mutationsträger; Pfeil, Indexpatient; 46, Angabe des Alters zum Zeitpunkt der Genotypisierung.

Das Kodon 278 ist sowohl beim Mensch, Schaf, Ratte, Rind und Maus hoch konserviert.

	Kodon 253 Lys > Arg	Kodon 278 Arg > Pro	
Mensch	: 242 NLEAEKFDLQEKFKQKQKYEINVLRNRINDNQKVSKT RG KAKVTGRWK	288	
Schaf	: 241 DLEAEKFDLQEKFKQKQKYEINVLRNRVNDNQKVSKT RG KAKVTGRWK	287	
Ratte	: 253 NLEAEKFDLQEKFKQKQKYEINVLRNRINDNQKVSKT RG KAKVTGRWK	299	
Rind	: 238 DLEAEKFDLQEKFKQKQKYEINVLRNRINDNQKVSKT RG KAKVTGRWK	284	
Maus	: 255 NLEAEKFDLQEKFKQKQKYEINVLRNRINDNQKVSKT RG KAKVTGRWK	301	
Huhn	: 253 DLEAEKFDLQEKFKRQKYEINVLRNRVSDHQKVKGSKAARGKTMVGG	299	

Abb. 9: Homologievergleich der Variante Arg278Pro und Lys253Arg zwischen den Proteinsequenzen des kardialen Troponin T und verschiedenen Spezies.

	Genotypen		
	HCM n=63	DCM n=48	Kontrollen n=46
Beobachtet			
GG	62	48	46
CC	0	0	0
G/C	1	0	0

Tab. 8: Beschreibung der beobachteten Genotypen der Mutation Arg278Pro (CGC/CCC) im Exons 16.

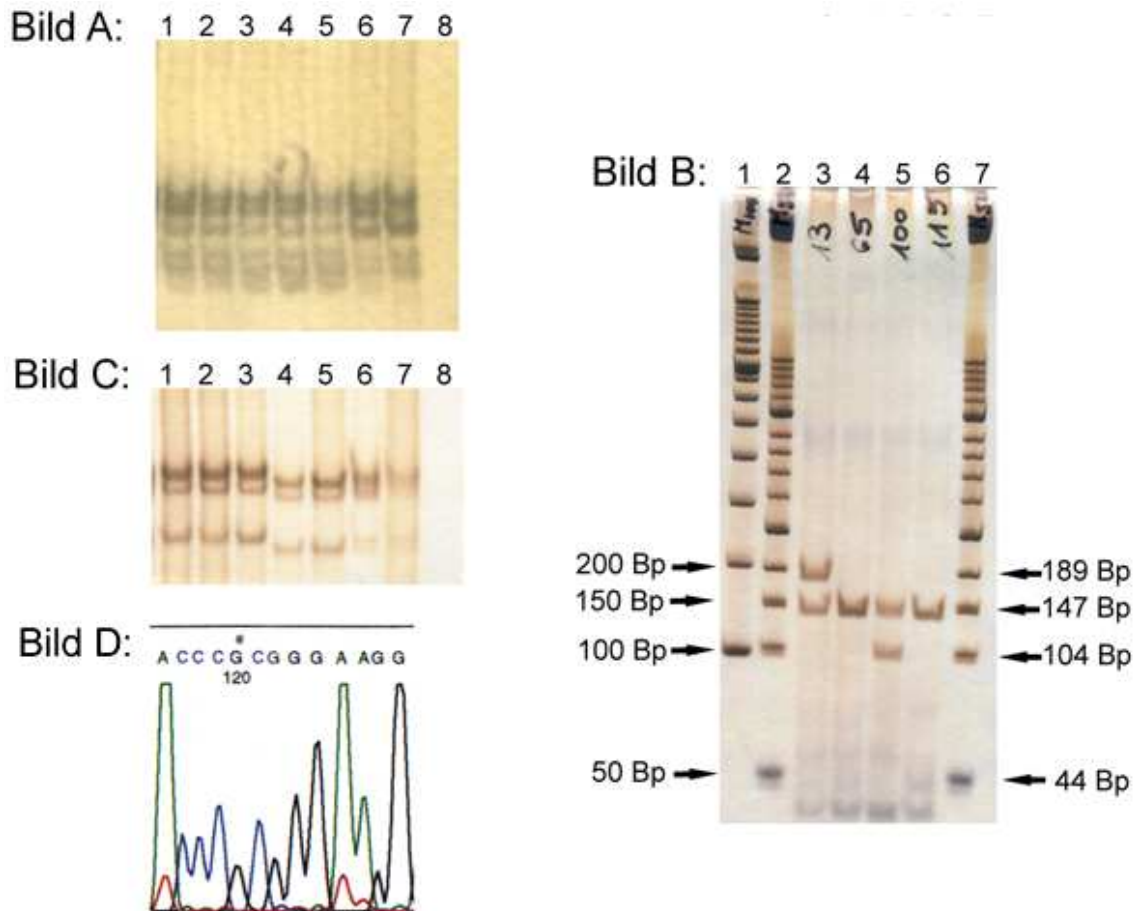


Abb. 10: Bild A: SSCP-Analyse ctntex 16 bei Raumtemperatur. Spur 1-4: HCM-Patienten. Spur 5: Indexpatient 13 (IVS +6 C/T 3'UTR). Spur 6: Indexpatient 65 (IVS +67 G/A 3'UTR). Spur 7: Indexpatient 100 (Arg278Pro). Spur 8: H₂O-Kontrolle. Bild B: *Sma*I-Verdau von ctntex16 mit den Indexpatienten 13, 65 und 100. Spur 1: 100 Bp-Marker. Spur 2 und 7: 50 Bp-Marker. Spur 3-6: verdaute PCR-Produkte. Bild C: SSCP-Analyse Troponin T ex16-Klone vom Indexpatienten 100. Spur 1-3: C-Allel-Klon. Spur 4-5: G-Allel-Klon. Spur 6: Indexpatient 100 reines PCR-Produkt. Spur 7: Klon 19. Spur 8: H₂O-Kontrolle. Bild D: Sequenzierungsausschnitt von ctntex 16 Indexpatient 100. Mit Punkt markierte Position kennzeichnet den G→C-Austausch im Kodon 278.

3.1.2. Variante IVS3 -11 (CTTCT)₁/(CTTCT)₂

Die Variante IVS3 -11 (CTTCT)₁/(CTTCT)₂ wurde mittels SSCP-Analyse sowohl bei 4°C als auch bei Raumtemperatur festgestellt (Abb. 11, Bild A). Bei dieser Veränderung handelt es sich um eine Insertion (CTTCT)₁/(CTTCT)₂ im Intron 3 an Position -11. Das durch das Primerpaar ctntex34 ebenfalls untersuchte Exon 3 und 4 zeigte keine Sequenzänderung. In allen drei Kollektiven war der Anteil der heterozygoten Anlageträger (CTTCT)₁/(CTTCT)₂ am häufigsten. Bei der Verteilung der homozygoten Varianten konnten mehr Träger mit der Variante (CTTCT)₁ als mit der Variante (CTTCT)₂ nachgewiesen werden. Die Bestätigung erfolgte mittels Heteroduplexanalyse. Die Probanden im SSCP-Gel als homozygot für die eine

oder andere Variante benannt, zeigten nur eine Bande in der Auswertung als die heterozygoten Träger mit einer Doppelbande.

	Genotypen				Allelfrequenzen		
	HCM n=63	DCM n=48	Kontrollen n=46		HCM n=63	DCM n=48	Kontrollen n=46
Beobachtet							
(CTTCT) ₂	8	8	6	(CTTCT) ₂	46	42	34
(CTTCT) ₁	25	14	18	-Allel	(0,3651)	(0,4375)	(0,3696)
(CTTCT) ₁ / (CTTCT) ₂	30	26	22				
Erwartet							
(CTTCT) ₂	8,39	9,17	6,28	(CTTCT) ₁	80	54	58
(CTTCT) ₁	25,39	15,19	18,28	-Allel	(0,6349)	(0,5625)	(0,6304)
(CTTCT) ₁ / (CTTCT) ₂	29,21	23,625	21,43				

Tab. 9: Übersicht über die beobachteten und erwarteten Genotypen und Verteilung der Allelfrequenzen der Variante IVS3 -11 (CTTCT)₁/(CTTCT)₂. Die Allelfrequenzen sind in Klammern angegeben.

	HCM	DCM	Kontrollen
p-Wert	0,896	0,875	0,994
χ²-Wert	0,895	0,266	0,123

Mit dem χ^2 -Test kann eine statistische Aussage über die Signifikanz der Abweichung der beobachteten von der erwarteten Genotypenhäufigkeit gemacht werden. Es findet somit eine Überprüfung statt, ob in einer Population eine Normalverteilung der Genotypen nach dem Mendelschen Gesetz besteht. Für die Variante IVS3 -11 (CTTCT)₁/(CTTCT)₂ konnte keine Abweichung zwischen den erwarteten und beobachteten Genotypen in den einzelnen Kollektiven ermittelt werden.

Die Variante liegt außerhalb von Spleiss-Konsensussequenzen, ein Einfluss auf das Spleissen der Troponin T mRNA ist daher unwahrscheinlich (http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html).

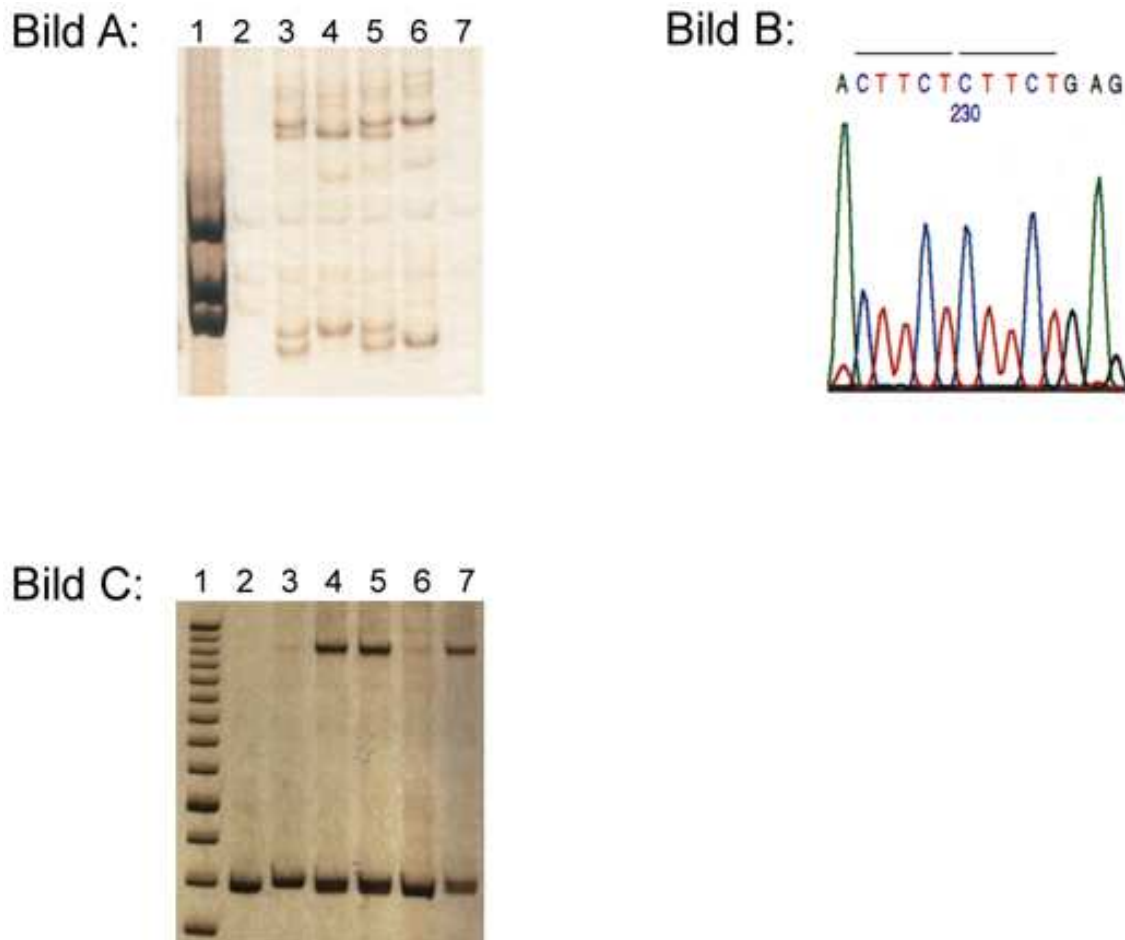


Abb. 11: Bild A: SSCP-Analyse ctnex 34 HCM-Kollektiv bei Raumtemperatur. Spur 1: Marker. Spur 2 und 7: H₂O-Kontrolle. Spur 3 und 5: Heterozygoter Merkmalsträger. Spur 4: Homozygoter Merkmalsträger für (CTTCT)₁. Spur 6: Homozygoter Merkmalsträger für (CTTCT)₂. Bild B: Sequenzierungsausschnitt von ctnex 34. Mit Strich markierte Positionen kennzeichnen die Variante (CTTCT)₂ im Intron 3 an Stelle -11. Bild C: Heteroduplexanalyse ctnex 34. Spur 1: Marker. Spur 2: unverdaute Probe. Spur 3: (CTTCT)₂-Allel. Spur 4, 5 und 7: (CTTCT)₁/(CTTCT)₂-Allel. Spur 6: (CTTCT)₁-Allel.

3.1.3. Variante IVS5 -49 G/A

Durch das Primerpaar ctnex 6 konnte diese Variante an der Position -49 im Intron 5 sowohl bei Raumtemperatur als auch bei 4°C im SSCP-Gel identifiziert werden (Abb. 12, Bild A). Es handelt sich um einen Einzelbasenaustausch (G/A). Im HCM-Patientenkollektiv sowie in den beiden Vergleichsgruppen zeigte sich wie bei der oben genannten Variante IVS3 -11 (CTTCT)₁/(CTTCT)₂ eine vermehrte Anzahl der heterozygoten Anlageträger im Vergleich zu den homozygoten Trägern.

Da die Variante nicht in einem Bereich eines Restriktionsenzym lag, konnte hier keine RFLP-Analyse etabliert werden. Auch ließ sich keine Amplifikation Created Restriction Site-Assay

(ACRS) durchführen, der modifizierte Primer konnte nicht optimiert werden. Die Korrektheit der vorliegenden Variante wurde mittels Kontrollsequenzierung bestätigt.

	Genotypen				Allelfrequenzen		
	HCM n=63	DCM n=48	Kontrollen n=46		HCM n=63	DCM n=48	Kontrollen n=46
Beobachtet							
GG	19	11	11	G -Allel	71	50	47
AA	11	9	10		(0,5635)	(0,5208)	(0,5109)
G/A	33	28	25				
Erwartet				A -Allel			
GG	20,00	13,02	13,59		55	46	45
AA	12,00	11,02	11,00		(0,4365)	(0,4792)	(0,4891)
G/A	30,99	23,96	22,99				

Tab. 10: Darstellung der beobachteten und erwarteten Genotypen und der ermittelten Allelfrequenzen der Variante IVS5 -49 G/A. Die Allelfrequenzen sind in Klammern angegeben.

	HCM	DCM	Kontrollen
p-Wert	0,903	0,714	0,799
χ^2-Wert	0,204	0,674	0,449

In den jeweiligen Kollektiven besteht keine Abweichung zwischen der Anzahl der beobachteten und erwarteten Genotypen.

Die Variante liegt im Intronbereich. Es konnte kein Einfluss auf eine mögliche Veränderung während des Spleissens ermittelt werden. Ein Effekt auf die Funktion ist daher unwahrscheinlich.



Abb. 12: Bild A: SSCP-Analyse ctntex 6 bei 4°C. Spur 1: G/A-Allel. Spur 2 und 3: G-Allel. Spur 4 und 5: A-Allel. Bild B: Sequenzierungsanalyse für die Variante IVS5 -49 (G/A). Die mit dem Punkt markierte Position zeigt den G→A Austausch.

3.1.4. Polymorphismus Ser69Ser (TCG/TCA) (G207A)

Eine Laufmusterabweichung zeigte sich besser bei Raumtemperatur als bei 4°C in der SSCP-Analyse des Exon 8-Abschnittes des kardialen Troponin T Gens durch den Primer ctntex 8 F/R neu (Abb. 13, Bild A). Bei dieser Variante handelt es sich um einen G zu A Austausch im Exon 8 an Position 4. Bei diesem Austausch kommt es zu keiner Änderung der Aminosäuresequenz (Ser zu Ser).

Das Basentriplett TCA konnte bei einem Patienten des HCM-Kollektives gesehen werden. Im Vergleichskollektiv trat diese Variante nicht auf. Hier wurde bei insgesamt 43 DCM-Patienten und 41 Kontrollen das Triplett TCG identifiziert. Bei 48 HCM-Patienten zeigte es sich ebenfalls. In heterozygoter Form konnte die Variante bei insgesamt 24 Probanden nachgewiesen werden, wobei sich diese auf 14 HCM-, 5 DCM-Patienten und 5 Kontrollen verteilte.

Der Nachweis erfolgte mittels Kontrollsequenzierung, da weder ein RFLP- noch ein ACRS-Assay etabliert werden konnten (Abb. 13, Bild B).

	Genotypen				Allelfrequenzen		
	HCM n=63	DCM n=48	Kontrollen n=46		HCM n=63	DCM n=48	Kontrollen n=46
Beobachtet							
GG	48	43	41	G	110	91	87
AA	1	0	0	-Allel	(0,8730)	(0,9479)	(0,9456)
G/A	14	5	5				
Erwartet							
GG	48,01	43,13	41,13	A	16	5	5
AA	1,01	0,13	0,14	-Allel	(0,1269)	(0,0520)	(0,0543)
G/A	13,96	4,73	4,72				

Tab. 11: Beobachtete Genotypen des Basenaustausches TCG zu TCA im Exon 8 an Position 4 (Ser69Ser).

	HCM
p-Wert	0,986
χ^2-Wert	0,290

Für das HCM-Kollektiv konnte keine Abweichung zwischen den erwarteten und beobachteten Genotypen bei der Anwendung des χ^2 -Wertes gesehen werden. Der χ^2 -Wert konnte durch das Fehlen des homozygoten Trägers für das A-Allel in den DCM- und Kontrollkollektiven nicht angewandt werden.

Beim Vorliegen des Basentriplets TCA ist der splice site score deutlich besser als bei TCG. Die Relevanz ist fraglich.

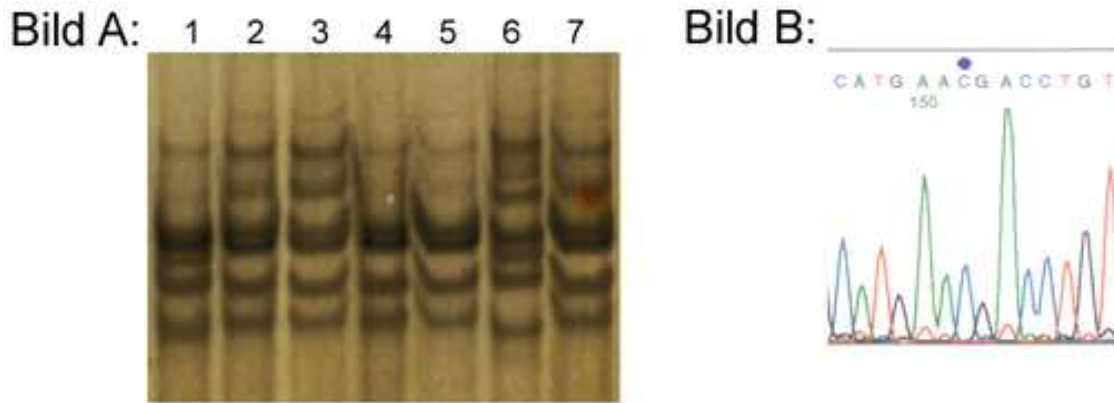


Abb. 13: Bild A: SSCP-Analyse ctntex 8 neu bei 4°C. Spur 1: G/A-Allel. Spur 2, 3, 4, 5 und 7: G-Allel. Spur 6: A-Allel. Bild B: Reverse-Sequenzierungsprotokoll Variante Ser69Ser. Die mit dem Punkt markierte Position zeigt den G→A-Austausch im Kodon 69.

3.1.5. Polymorphismus Ile106Ile (ATT/ATC) (T318C)

Im Kodon 106 des kardialen Troponin T Gens konnte ein T→C-Austausch festgestellt werden. Dieser Polymorphismus hat keine Wirkung auf die AS-Sequenz. Er zeigt sich bei beiden Temperaturen (RT, 4°C) bei insgesamt 29 Patienten der HCM-Gruppe und nur bei 20 Patienten mit DCM und 21 Kontrollen (Abb. 14, Bild A). Homozygot führ das Merkmal ATC waren aus allen drei Gruppen nur 11 Personen, hingegen für das Merkmal ATT insgesamt 58. Durch die T zu C Substitution wird eine Restriktionsschnittstelle für die Endonuklease *TaqI* gebildet. Bei der Amplifikation mittels des Vorwärts-Primer ctntex 9 F b und dem Rückwärts-Primer ctntex 9 R entsteht ein 241 Bp langes PCR-Produkt. Durch die Restriktionsendonuklease *TaqI* werden nun bei Patienten mit der Variante ATC 2 Fragmente mit der Größe 126 Bp und 115 Bp gebildet. Die Personen, die für ATT homozygot waren, zeigten ein Fragment mit einer Länge von 241 Bp. Durch den Restriktionsverdau der DNA einer heterozygoten Person entstehen 3 Fragmente (241 Bp, 126 Bp, 115 Bp) (Abb. 14 Bild C).

Die Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Thierfelder identifizierte diesen Polymorphismus bereits in ihrem Patientengut. Durch freundliche Zusendung von drei DNA-Proben seines Kollektivs konnten wir unser Kollektiv mit seinem vergleichen. Es wurde eine neue PCR-Analyse von drei Patienten aus unserer HCM-Gruppe (2 homozygote, 1 heterozygoter Träger) mit den drei DNA-Proben von Prof. Dr. Thierfelder amplifiziert. Die SSCP-Analyse bestätigte bei allen Proben das durch uns zuvor ermittelte Ergebnis (Abb. 14, Bild A).

	Genotypen			Allelfrequenzen			
	HCM n=63	DCM n=48	Kontrollen n=46		HCM n=63	DCM n=48	Kontrollen n=46
Beobachtet							
TT	30	23	23	T -Allel	89	66	67
CC	4	5	2		(0,7063)	(0,6875)	(0,7283)
T/C	29	20	21				
Erwartet							
TT	31,43	22,69	24,40	C -Allel	37	30	25
CC	5,43	4,69	3,40		(0,2937)	(0,3125)	(0,2717)
T/C	26,14	20,63	18,20				

Tab. 12: Genotyp- und Allelfrequenzenverteilung der ATT zu ATC Basensubstitution im Exon 9 an Nukleotidposition 54 (Ile106Ile). Die Allelfrequenzen sind in Klammern angegeben.

	HCM	DCM	Kontrollen
p-Wert	0,868	0,956	0,802
χ^2-Wert	0,283	0,908	0,441

Eine Übereinstimmung der beobachteten zu den erwarteten Genotypen in jeder Gruppe ergab keine Abweichung im Hardy-Weinberg-Equilibrium. Signifikante Unterschiede waren im χ^2 -Wert nicht zu ermitteln.

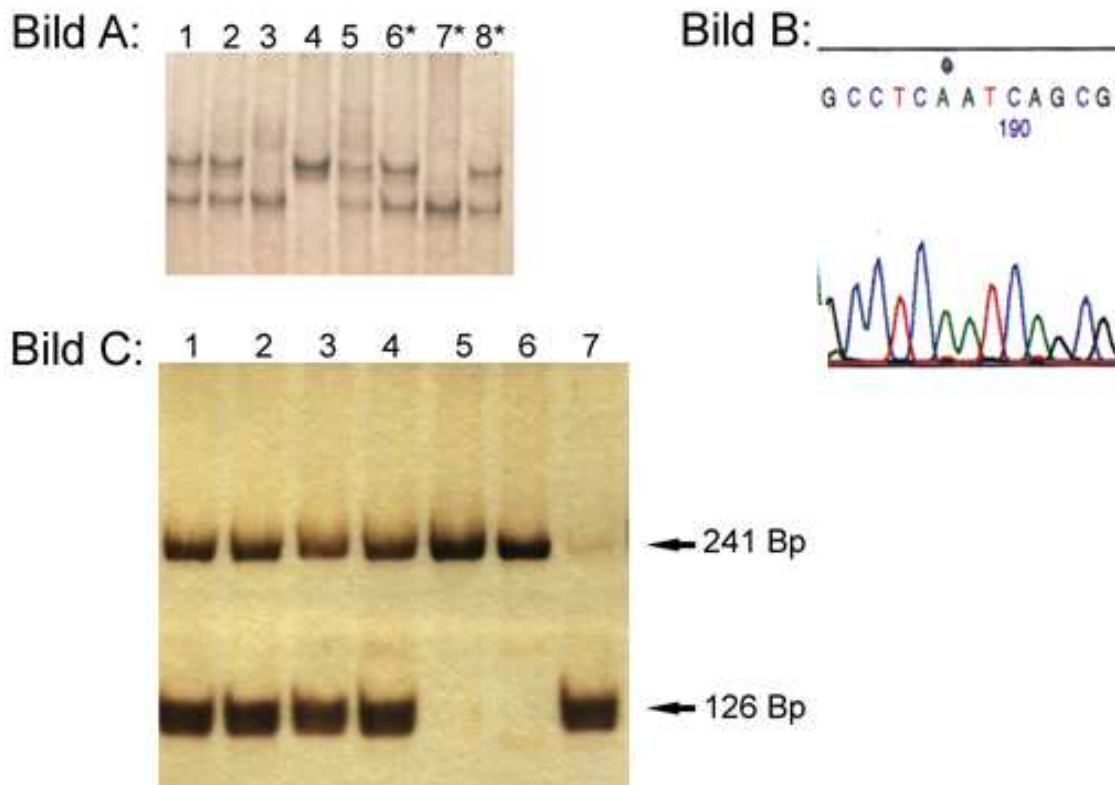


Abb. 14: Bild A: SSCP-Analyse ctnx 9 mit HCM-Kollektiv und den Kontrollen der Arbeitsgruppe Thierfelder (*) bei Raumtemperatur. Spur: 1, 2, 5, 6 und 8: T/C-Allel. Spur 3 und 7: T-Allel. Spur 4: C-Allel. Bild B: Reverse-Sequenzierungsanalyse ctnx 9 mit der Variante Ile106Ile. Der mit dem Punkt markierte Abschnitt zeigt den T→C-Austausch im Kodon 106. Bild C: RFLP-Assay für ctnx 9 mit *TaqI*. Spur 1-4: C/T-Allel. Spur 5 und 6: T-Allel. Spur 7: C-Allel.

3.1.6. Variante IVS9 -97 (CCCCC/CCCC)

Bei der SSCP-Analyse des Fragmentes, welches durch das Primerpaar ctnx 11 F S/10 R S amplifiziert wurde, konnte ebenfalls eine Abweichung im Laufmuster bei 4°C und RT festgestellt werden (Abb. 15, Bild A). Sie zeigt eine Deletion CCCCC zu CCCC an der Position -97 im Intron 9. Im Exon 10 wurde keine Sequenzänderung bestimmt. Auffallend ist, dass keiner der 157 untersuchten Personen homozygot für das Merkmal CCCC war. Und die Ausprägung der heterozygoten Variante wurde nur bei jeweils 2 Patienten im HCM- und Kontroll-Kollektiv bestimmt. Die Gruppe der Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie war einheitlich homozygot für die Variante CCCCC. Ein passendes Restriktionsenzym (*EcoNI*) konnte für diese Variante ermittelt werden. Bei der PCR entsteht ein Basisfragment mit einer Größe von 244 Bp. Verdaut man nun die PCR-Produkte mit *EcoNI*, so tritt bei der Gelelektrophorese bei allen Varianten eine kurze Bande mit 11 Bp auf. Die heterozygoten Träger und die homozygoten für CCCCC zeigen zusätzlich noch jeweils eine 44 Bp- und 189 Bp-Bande. Eine Bande mit der Größe 232 Bp trat noch zusätzlich bei den heterozygoten

Trägern auf. Die Variante für das Merkmal CCCC wurde mittels RFLP nicht nachgewiesen (232 Bp, 11 Bp) (s. Abb. 5, S. 33 in Kapitel 2.2.8.3).

	Genotypen				Allelfrequenzen		
	HCM n=63	DCM n=48	Kontrollen n=46		HCM n=63	DCM n=48	Kontrollen n=46
Beobachtet							
CCCCC	61	48	44	CCCCC -Allel	124	96	90
CCCC	0	0	0		(0,9841)	(1,00)	(0,9783)
CCCCC/ CCCC	2	0	2				
Erwartet							
CCCCC	61,01	Nicht berechnet	44,03	CCCC -Allel	2	0	2
CCCC	0,02		0,02		(0,0159)	(0,00)	(0,022)
CCCCC/ CCCC	1,97		1,98				

Tab. 13: Zusammenfassung der beobachteten und erwarteten Genotypen und Überblick über die Allelfrequenzen der Deletion CCCCC zu CCCC im Intron 9 an Position -97. Die Allelfrequenzen sind in Klammern angegeben.

Der chi²-Wert konnte durch das Fehlen des homozygoten Trägers für das CCCC-Allel in allen Kollektiven und des heterozygoten Merkmalsträgers im DCM-Kollektiv nicht angewandt werden.

Diese Intronvariante hat wahrscheinlich keinen Effekt auf der RNA-Ebene. Es konnte kein Einfluss auf eine Spleiss-Position ermittelt werden.

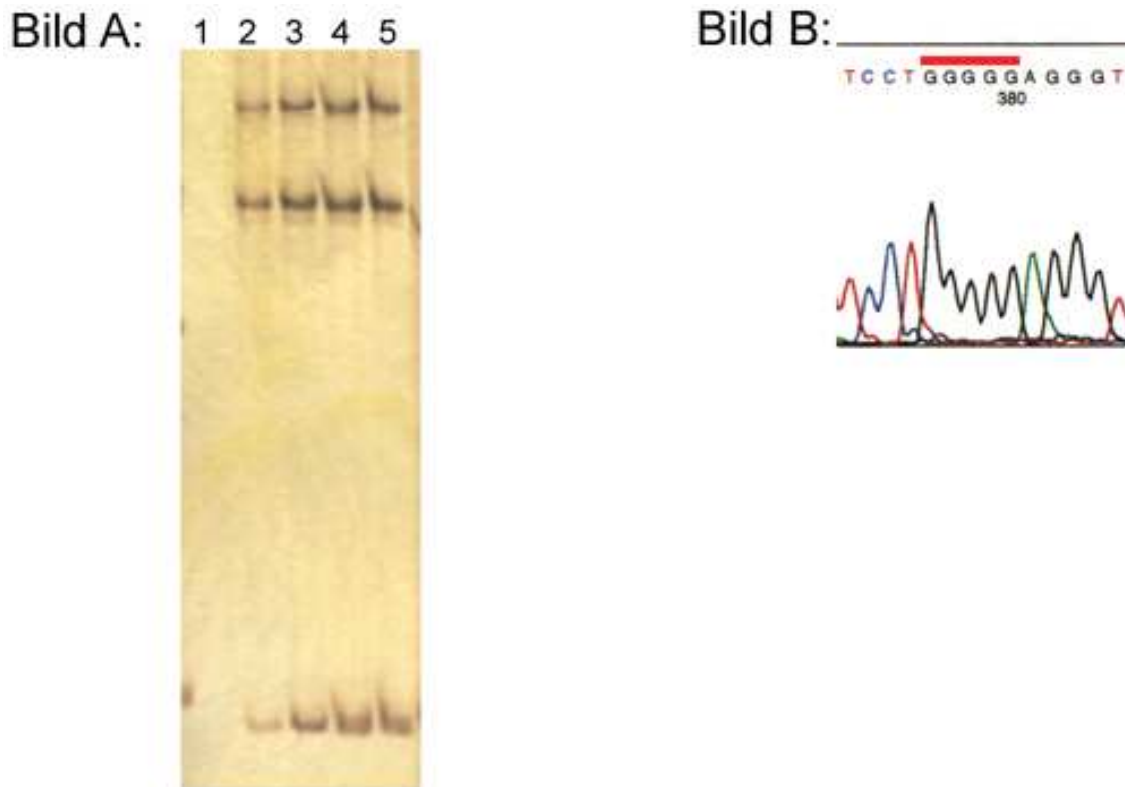


Abb. 15: Bild A: SSCP-Analyse ctnx 10 bei Raumtemperatur. Spur 1: H₂O-Kontrolle. Spur 2, 3 und 5: CCCC-Allel. Spur 4: Mutante (CCCC/CCCC). Bild B: Reverse-Sequenzierungsprotokoll Variante IVS9 -97 (CCCC/CCCC). Die mit dem Strich gekennzeichnete Position zeigt die Deletion an Position -97.

3.1.7. Variante IVS11 -32 C/A

Durch das Primerpaar ctnx 12 F/R wurde im Intron 11 an Position -32 der Einzelbasenaustausch C/A identifiziert. Die Variante stellte sich sowohl bei RT als auch bei 4°C deutlich dar (Abb. 16, Bild A). Insgesamt waren 72 Probanden heterozygot und 73 Probanden homozygot für die Variante -32 C. Die Verteilung in den einzelnen Kollektiven war annähernd gleich. Dagegen waren nur 12 von den insgesamt 157 untersuchten Patienten homozygot für die Variante -32 A. Diese Variante konnte nicht mit einer Restriktionsanalyse noch mit einem Amplification Created Restriction Site-Assay bestätigt werden. Es erfolgte eine Kontrollsequenzierung (Abb. 16, Bild B).

	Genotypen				Allelfrequenzen		
	HCM n=63	DCM n=48	Kontrollen n=46		HCM n=63	DCM n=48	Kontrollen n=46
Beobachtet							
CC	28	22	23	C-Allel	86	65	67
AA	5	5	2		(0,6825)	(0,6771)	(0,7282)
C/A	30	21	21				
Erwartet							
CC	29,35	22,01	24,39	A-Allel	40	31	25
AA	6,35	5,00	3,40		(0,3175)	(0,3229)	(0,2718)
C/A	27,30	20,99	18,21				

Tab. 14: Genotypenbestimmung und Darstellung der Allelfrequenzen der Variante IVS11 -32 C/A. Die Allelfrequenzen sind in Klammern angegeben.

	HCM	DCM	Kontrollen
p-Wert	0,879	0,993	0,441
χ^2-Wert	0,258	0,139	0,441

Es besteht keine Abweichung zwischen der Anzahl der beobachteten und erwarteten Genotypen in den einzelnen Kollektiven.

Ein Effekt auf die Funktion konnte nicht belegt werden.

Bild A: 1 2 3 4 5 6

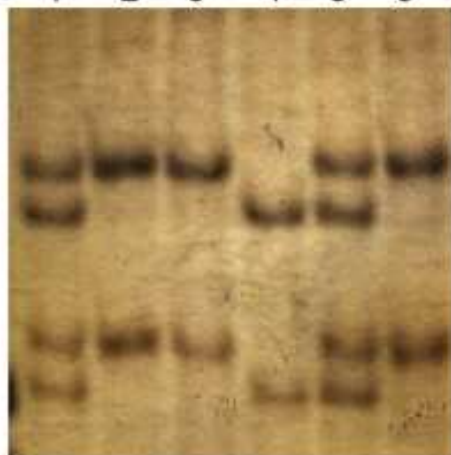


Bild B:

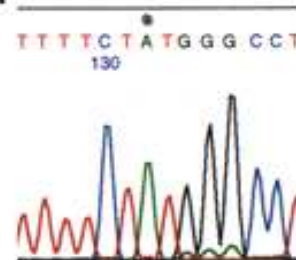


Abb. 16: Bild A: SSCP-Analyse cntex 12 bei Raumtemperatur. Spur 1 und 5: Heterozygoter Patient. Spur 2, 3 und 6: C-Allel. Spur 4: A-Allel. Bild B: Sequenzierungsanalyse Variante IVS11 -32 C/A. Die markierte Position kennzeichnet den C→A-Austausch.

3.1.8. Mutation Lys253Arg (AAG/AGG) (A758G)

Im Exon 14 des *TNNT2* fand sich ein Nukleotidaustausch (A758G), der zu einem Aminosäureaustausch von Lysin (AAG) zu Arginin (AGG) an Position 69 führt. Hierbei kommt es zu keiner Ladungsänderung durch den AS-Austausch. Die Patienten mit hypertropher Kardiomyopathie waren alle homozygot für die Variante AAG. In den immer mituntersuchten beiden Vergleichskollektiven wurden 2 DCM-Patienten und ein Patient aus der Kontrollgruppe als heterozygote Anlagenträger identifiziert. Niemand war homozygot für die Variante AGG. Eine Restriktionsschnittstelle für eine Endonuklease konnte primär nicht ermittelt werden. Ein neues Primerpaar cntex 14 FM/RM fügte einen „mismatch“ in die Sequenz ein (s. 2.2.8.4.), dadurch wurde nun eine Restriktionsschnittstelle für die Endonuklease *EarI* eingefügt. Beim Verdau des PCR-Produktes entsteht für die AAG-Variante nur eine Bande mit 153 Bp. Bei den Patienten, die homozygot für AGG waren, ergab die Auswertung der Banden eine mit 129 Bp und eine mit 24 Bp. Die heterozygoten Merkmalsträger zeigten alle drei Banden (Abb. 17, Bild C).

Der Aminosäureaustausch Lys253Arg ist sowohl bei Mensch, Schaf, Rind, Ratte, Maus und Huhn konserviert (Kapitel 3.1.1., Abb. 9., S. 43).

Genotypen			
	HCM n=63	DCM n=48	Kontrollen n=46
Beobachtet			
AA	46	46	45
GG	0	0	0
A/G	0	2	1

Tab. 15: In der Tabelle sind die beobachteten Genotypenverteilungen des Nukleotidaustausches AAG zu AGG im Exon 14 an Position 69 (Lys253Arg) aufgelistet.

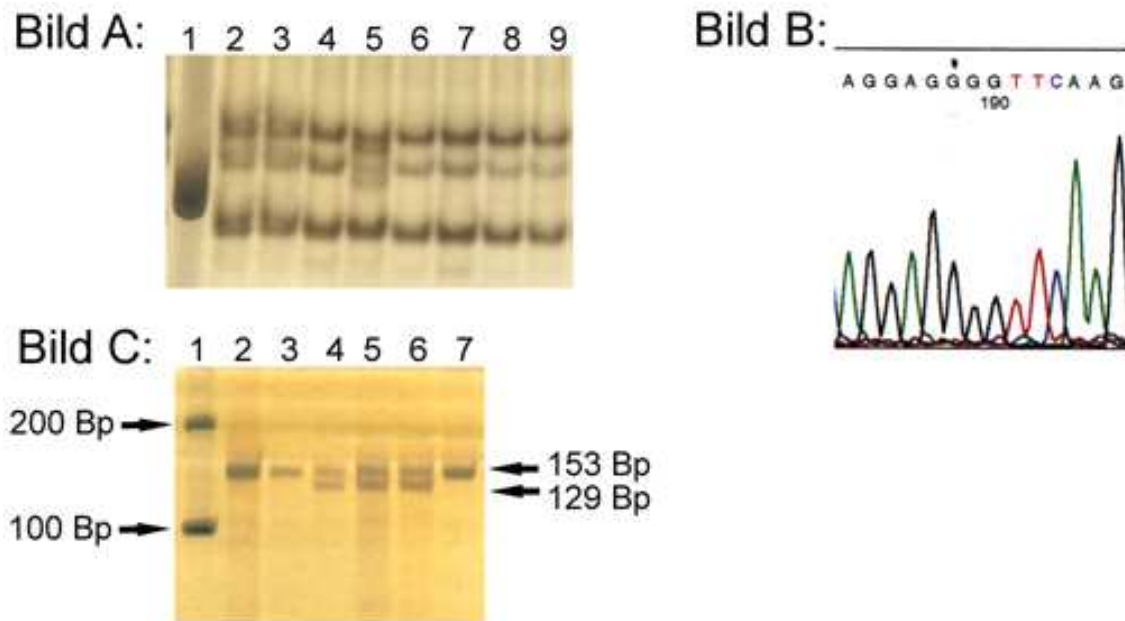


Abb. 17: Bild A: SSCP-Analyse ctnex 14 bei Raumtemperatur. Spur 1: Marker. Spur 2, 3, 4, 6, 7, 8 und 9: A-Allel. Spur 5: Indexpatient 287 mit G/A-Allel. Bild B: Sequenzierungsprotokoll Variante Lys253Arg. Die mit dem Punkt markierte Position zeigt den A→G-Austausch im Kodon 253. Bild C: *EarI*-RFLP für ctnex 14. Spur 1: 100 Bp-Marker. Spur 2 und 3: A-Allel. Spur 4-6: G/A-Allel. Spur 7: unverdaute Probe.

3.1.9. Variante IVS14 –33 T/C

Im Intron 14 des *TNNT2* wurde eine Variante an der Position –33 entdeckt (4°C, RT). Hierbei kommt es bei insgesamt 33 Probanden zu einem T/C-Austausch. Nur ein Patient der Kontrollgruppe zeigte den Genotyp TT. Alle anderen Patienten waren homozygot für die Mutation CC. Der Nachweis gelang mittels Restriktionsverdau durch das Restriktionsenzym *TspRI*. Bei der Amplifikation der genomischen DNA mit dem Primerpaar ctnex 15 F/R entstand ein PCR-Produkt mit der Länge 195 Bp. Bei Patienten, die homozygot für das T-Allel waren, ergab sich keine Schnittstelle für *TspRI*. Sie zeigten die PCR-Produktlänge. Durch den Basenaustausch T→C wurden zusätzlich zur 195 Bp-Bande noch die Fragmentgrößen 54 Bp und 141 Bp gebildet. Homozygote mit der anderen Variante bildeten nur die letzten beiden Banden aus.

	Genotypen				Allelfrequenzen		
	HCM n=63	DCM n=48	Kontrollen n=46		HCM n=63	DCM n=48	Kontrollen n=46
Beobachtet							
CC	55	35	37	C -Allel	118	83	86
TT	0	0	1		(0,9365)	(0,8646)	(0,9348)
T/C	8	13	12				
Erwartet							
CC	55,25	35,88	40,20	T -Allel	8	13	14
TT	0,25	0,88	1,07		(0,0635)	(0,1354)	(0,1522)
T/C	7,49	11,24	13,10				

Tab. 16: Darstellung über die beobachteten und erwarteten Genotypen und Aufteilung der Allelfrequenzen des Basenaustausches T zu C im Intron 14 an Position –33. Die Allelfrequenzen sind in Klammern angegeben.

	Kontrollen
p-Wert	0,998
χ^2-Wert	0,304

Der χ^2 -Wert konnte durch das Fehlen des homozygoten Trägers für das T-Allel in den HCM- und DCM-Kollektiven nicht angewandt werden. Für das Kontroll-Kollektiv ergab sich keine signifikante Abweichung der beobachteten zu den erwarteten Genotypen.

Ein Spleiss-Effekt konnte nicht ermittelt werden. Eine Wirkung auf die Funktion ist nicht wahrscheinlich.

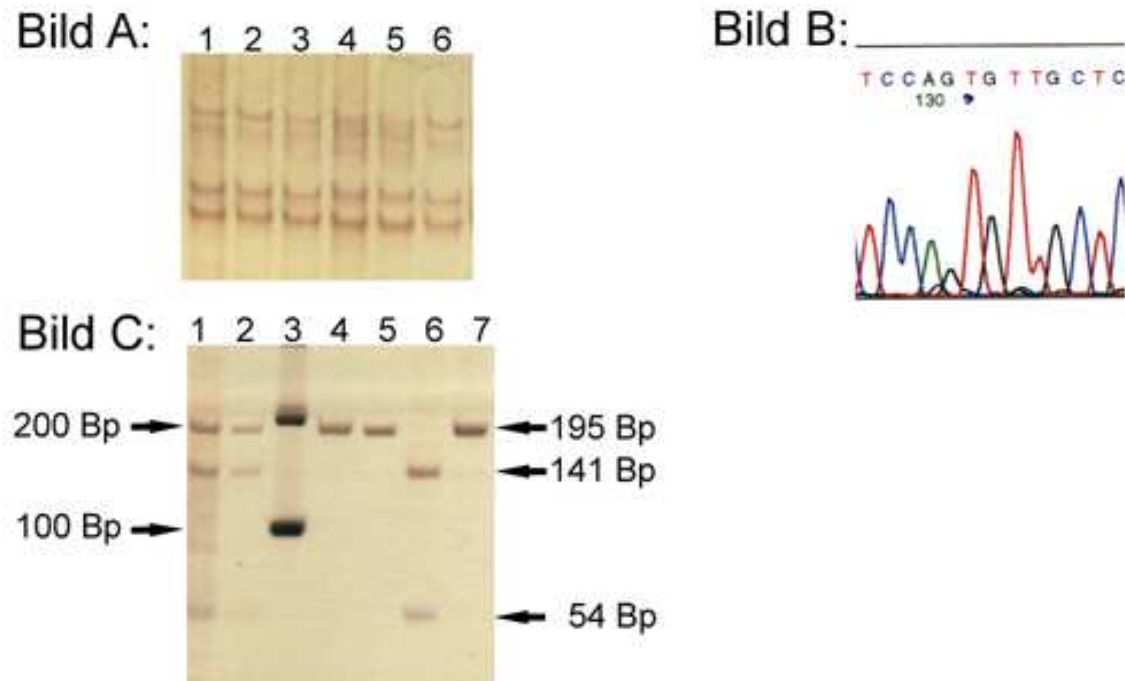


Abb. 18: Bild A: SSCP-Analyse ctnx15 bei 4°C. Spur 1, 2, 3 und 6: T-Allel. Spur 4 und 5: T/C-Allel. Bild B: Sequenzierungsanalyse ctnx15. Die mit einem Punkt markierte Position zeigt den T→C-Austausch im Intron 14. Bild C: *TspRI*-RFLP für IVS14-33 T/C. Spur 1 und 2: T/C-Allel. Spur 3: 100 Bp-Marker. Spur 4, 5 und 7: T-Allel. Spur 6: C-Allel.

3.1.10. Variante +6 C/T 3'UTR

Bei Raumtemperatur konnte bei der SSCP-Analyse von Exon 16 diese Variante ermittelt werden. (Abb. 10, Bild A, im Kapitel 3.1.1, S. 44). Bei der Variante handelt es sich um einen Einzelbasenaustausch C zu T an Position 6 in der untranslatierten Region im Exon 16. Es zeigte sich, dass nur 5 Probanden heterozygot für die Variante sind. Der Rest ist homozygot für das C-Allel. Der Nachweis konnte wie die Variante Arg278Pro mit der Restriktionsendonuklease *SmaI* erfolgen (Abb. 10, Bild B, im Kapitel 3.1.1, S. 44). Das 189 Bp große PCR-Fragment wurde bei den heterozygoten Anlageträgern noch in ein 147 Bp langes und 44 Bp kurzes Fragment verdaut. Die homozygoten Personen für das C-Allel wiesen nur eine 147 Bp- und eine 44 Bp-Bande auf. Niemand zeigte eine einzelne 189 Bp-Bande für die T-Variante.

	Genotypen			Allelfrequenzen			
	HCM n=63	DCM n=48	Kontrollen n=46		HCM n=63	DCM n=48	Kontrollen n=46
Beobachtet							
CC	62	46	44	C	125	94	90
TT	0	0	0	-Allel	(0,9921)	(0,9792)	(0,9783)
C/T	1	2	2				
Erwartet							
CC	62,00	46,02	44,02	T	1	2	2
TT	0,003	0,02	0,02	-Allel	(0,0079)	(0,0209)	(0,0217)
C/T	0,98	1,96	1,95				

Tab. 17: In der Tabelle sind die beobachteten und erwarteten Genotypen und ermittelten Allelfrequenzen der Variante +6 C/T in der 3'UTR des Exons 16 beschrieben. Die Allelfrequenzen sind in Klammern angegeben.

Eine statistische Aussage über die Signifikanz der Abweichung der beobachteten von der erwarteten Genotypenhäufigkeit konnte durch das Fehlen des T-Allel in allen untersuchten Kollektiven nicht gemacht werden.

Die Variante wurde nur bei 5 Probanden des Gesamtkollektives ermittelt. Durch die Lage der Variante in der 3'UTR ist eine Wirkung auf die Funktion nicht wahrscheinlich.

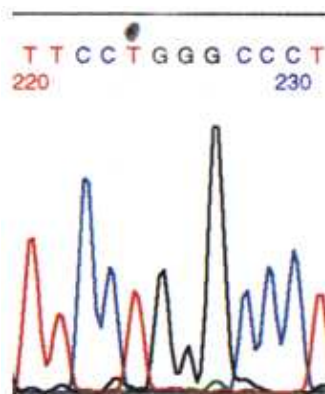


Abb. 19: Sequenzierungsprotokoll für die Variante +6 C/T 3'UTR. Der Austausch C→T ist mit einem Punkt markiert.

3.1.11. Variante +67 G/A 3'UTR

In der untranslatierten Region des Exon 16 konnte die Variante +67 G/A festgestellt werden. Sie zeigte sich bei Raumtemperatur im SSCP-Gel jedoch nicht bei allen Probanden (Abb. 10, im Kapitel 3.1.1., S. 44). Erst durch die Nachweismethode mit dem Restriktionsenzym *BsRI* konnten insgesamt 3 von vorher nur 2 detektierten HCM-Patienten und jeweils noch ein Patient aus den beiden Vergleichskollektiven für den Einzelbasenaustausch G→A identifiziert werden (Abb. 20, Bild A, S. 62). Sie zeigten die Bandenverteilung 189 Bp, 137 Bp und 52 Bp im Gel. Homozygot für den Genotyp AA war niemand von den 157 untersuchten Probanden. Somit wurde keine einzelne Bande mit 189 Bp gesehen. Der Rest war homozygot für das G-Allel mit der Verteilung 137 Bp und 52 Bp.

	Genotypen				Allelfrequenzen		
	HCM n=63	DCM n=48	Kontrolle n=46		HCM n=63	DCM n=48	Kontrollen n=46
Beobachtet							
GG	60	47	45	G -Allel	123	95	91
AA	0	0	0		(0,9762)	(0,9896)	(0,9891)
G/A	3	1	1				
Erwartet				A -Allel			
GG	60,04	47,00	45,00		3	1	1
AA	0,03	0,05	0,05		(0,0234)	(0,0104)	(0,0109)
G/A	2,88	0,99	0,99				

Tab. 18: Charakterisierung der beobachteten und erwarteten Genotypen und Auflistung der Allelfrequenzen der Basensubstitution G zu A an Position +67 in der untranslatierten Region am 3' -Ende des Exon 16. Die Allelfrequenzen sind in Klammern angegeben.

Der χ^2 -Wert konnte durch das Fehlen des homozygoten Trägers für das A-Allel in allen Kollektiven nicht angewandt werden.

In der untranslatierten Region ist ein Effekt nicht wahrscheinlich.

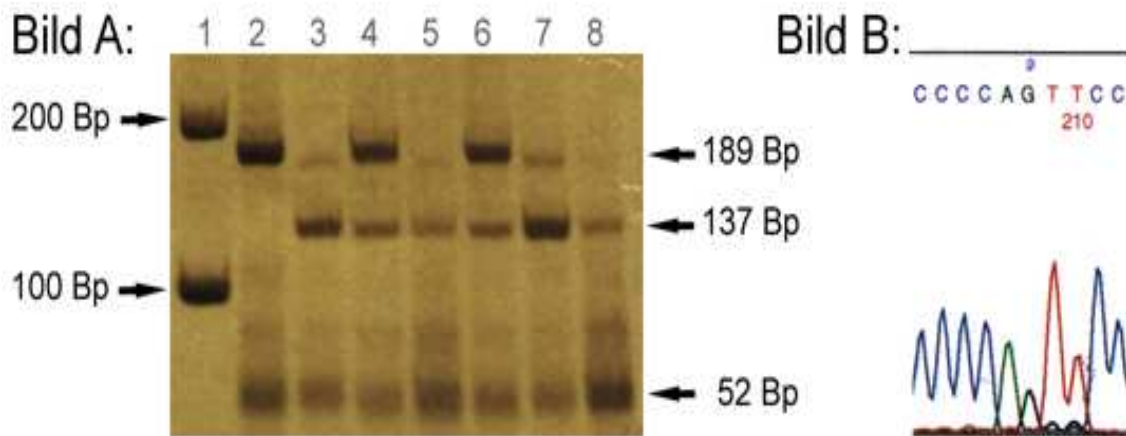


Abb. 20: Bild A: RFLP-Assay mit *BsrI*. Spur 1: 100 Bp-Marker. Spur 2: unverdaute Probe mit PCR-Produktlänge 189 Bp. Spur 3, 5, 7 und 8: G-Allel. Spur 4 und 6: Indexpatient 65 und Patient 1249 (G/A-Allel). Kein Patient zeigt das A-Allel. Bild B: Sequenzierungsanalyse +67 G/A 3'UTR. Die Position des G→A-Austausches ist mit einem Punkt markiert.

3.1.12. Ergebnisse der Untersuchungen in den Abschnitten 2, 5, 7 und 11 des kardialen Troponin T Gens

Die Auswertung der SSCP-Gele für die Primer von Exon 2, 5, 7 und 11 ergab in den untersuchten Intron-Exon-Abschnitten keine Laufmusterabweichung bei 4°C noch bei Raumtemperatur. So wurden in diesen Abschnitten des *TNNT2* keine Varianten identifiziert.

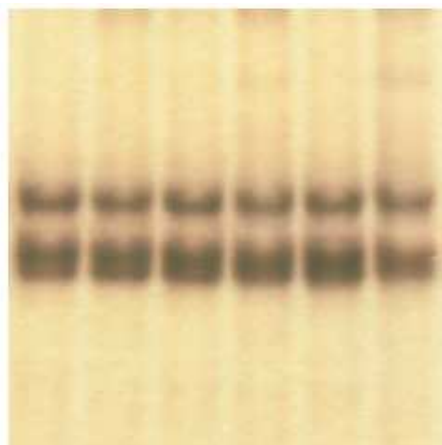


Abb. 21: SSCP-Analyse für *ctnxt2* bei 4°C. Es zeigt sich keine Laufmusterabweichung im nicht-denaturierendem Gel.

4. Diskussion

Zum Zeitpunkt des Studienbeginns im Jahre 1996 waren ausschließlich molekulargenetische Ergebnisse an Familien mit hypertropher Kardiomyopathie vorliegend. Sie beschränkten sich mit ihren genetischen Analysen und prozentualen Verteilungen auf die bis dahin in Familien identifizierten Gene *MYHH7*, *TNNT2*, *TPM1* und *MYBPC3*. Im kardialen Troponin T Gen berichteten zuerst Thierfelder et al. (1994) und Watkins et al. (1995a) über Mutationen bei familiärer hypertropher Kardiomyopathie. Hierbei wurden zumeist kleinere Familien mit mehreren manifest erkrankten Personen, manchmal auch nur die Indexpatienten in den betroffenen Familien und gelegentlich auch sporadische Fälle untersucht. Bei der hier durchgeführten systematischen Mutationssuche wurden 63 konsekutive, nicht verwandte Patienten eines Überweisungskrankenhauses mittels PCR-SSCP-Analyse auf Mutationen im kardialen Troponin T Gen untersucht. Es konnten insgesamt 11 unterschiedliche Sequenzabweichungen identifiziert werden. Dabei handelte es sich um eine Mutation, die eine Aminosäuresubstitution (Arg278Pro) zur Folge hatte. Die anderen identifizierten Varianten waren zwei Einzelbasenaustausche im Exon ohne AS-Austausch (Ser69Ser, Ile106Ile), eine 1-Bp Deletion [IVS9 -97 (CCCC/CCCC)], vier Einzelbasensubstitutionen im Intron [IVS3 -11 (CTTCT)₁/(CTTCT)₂, IVS5 -49 G/A, IVS11 -32 C/A, IVS14 -33 T/C] und zwei 3'UTR-Einzelbasenaustausche (+6 C/T 3'UTR, +67 G/A 3'UTR). Um zu überprüfen, ob diese gefundenen genetischen Varianten spezifisch für das HCM-Kollektiv sind oder ob eine ähnliche Verteilung in anderen Kollektiven ebenfalls zu beobachten ist, wurden 48 unverwandte DCM-Patienten aus dem gleichen Überweisungskrankenhaus und 46 gesunde Blutspender (Kontrollen) in den gleichen Intron-Exon-Abschnitten im kardialen Troponin T Gen untersucht. Dabei wurde die Mutation Arg278Pro nicht identifiziert. Aber eine zuvor nicht ermittelte Mutation Lys253Arg zeigte sich bei 2 DCM-Patienten und einer Kontrolle. Hierbei handelt es sich um einen Einzelbasenaustausch, der zu einer Aminosäuresubstitution führt.

4.1. HCM eine klinisch heterogene Erkrankung

In den letzten Jahren ist die Erforschung der unterschiedlichen Ätiologien von Erkrankungen des kardiovaskulären Formenkreises wie z.B. der arteriellen Hypertonie, ischämischer Herzerkrankungen und der hypertrophen und dilatativen Kardiomyopathie in das Zentrum des Interesses gerückt. Dabei konnte durch unterschiedliche Studien belegt werden, dass

krankheitsverursachende Gene als Faktoren für die Entstehung und die Vielschichtigkeit kardiovaskulärer Erkrankungen und für den Grad ihrer Ausprägung verantwortlich sind [Raynolds et al. (1993), Lindpainter (1994), Thierfelder et al. (1993)]. Auch durch das Zusammenspiel mehrerer Gene, ihrer Expression innerhalb eines Individuums, der unterschiedlichen Herkunft der betroffenen Personen, durch pathogene Viren sowie das unterschiedliche Alter kann das Krankheitsbild phänotypisch unterschiedlich geprägt sein [Lindpainter (1994), McKenna et al. (1981), Poller et al. (2005)].

In dieser Arbeit wurden Patienten mit hypertropher Kardiomyopathie näher untersucht. Die HCM wird durch unterschiedliche überwiegend autosomal-dominant vererbte Mutationen in unterschiedlichen Genen, die für Sarkomerproteine (*MYH7*, *TNNT2*, *TPM1*, *TNNT1*, *MYBPC3*, etc.) und nicht-Sarkomerproteine (*KCNQ4*, *MTTI*, *PRKAG2*) kodieren, verursacht. Auch wurde sporadisches Auftreten der Erkrankung beschrieben, welches durch „de-novo“-Mutationen bedingt sein soll [Watkins et al. (1992)]. Durch die Vielzahl der unterschiedlichen identifizierten Loci führte dies zu der Aussage, dass die hypertrophe Kardiomyopathie eine genetisch heterogene Erkrankung ist [Schwartz et al. (1995)].

Die o.g. Sarkomerproteine spielen bei der Kontraktion und der Verkürzung der Herzmuskelzellen sowie ihrer Ca-abhängigen Regulation eine zentrale Rolle. Durch abnormales Kontraktionsverhalten der kardialen Myofibrillen kommt es zu klinischer, histologischer und morphologischer Manifestation der hypertrophen Kardiomyopathie. Diese Umbauprozesse betreffen vorwiegend die linken Ventrikelwände, was zu Veränderungen in der normalen Reizweiterleitung führt und somit als arrhythmogenes Substrat wirken kann wie z.B. verstärkte Bildung von Rhythmusstörungen.

Unterschiedliche Quellen belegen, (1) dass mutierte Proteine ihre Basisfunktion beibehalten, aber kinetische oder andere Veränderungen bedingen, die wiederum eine pathologische Muskelkontraktion verursachen [Morimoto et al. (1998), Lin et al. (1996)], (2) dass Studien an isolierten Zellen oder Muskelfasern, die ein mutationsverändertes Protein beinhalteten, ebenfalls einen gestörten Muskelkontraktionsablauf gezeigt haben [Watkins et al. (1996), Sweeney et al. (1998)] und (3) dass unterschiedliche Tiermodelle mit transgenen Tieren mit HCM-gekoppelten Mutationen ein nahezu physiologisches in vivo Modell von HCM widerspiegeln [Tardiff et al. (1998), Geisterfer-Lowrance et al. (1996)]. Dabei aber festgestellt wurde, dass je nach Art der zugrundeliegenden Mutation sowie je nach betroffenem Gen der HCM-Phänotyp unterschiedlich ausfällt. In einem Versuch diesen Einfluss zu belegen, wurden

Genotyp-Phänotyp Korrelationen für eine geringe Anzahl von Mutationen im β -MHC, *TNNT2* und *MYBPC3* durchgeführt. So zeigen Mutationen im β -MHC Gen, bei denen es zu einer Ladungsänderung kommt z.B. der Arginin Gruppe im Kodon 403, 453 und 719, eine hohe Inzidenz der krankheitsbedingten Mortalität und somit eine schlechte Prognose. Neutrale Mutationen wie Leu908Val, Val606Met verzeichnen dagegen einen milden Verlauf mit guter Prognose. Die Ausprägung der myokardialen Hypertrophie ist bei β -MHC ausgedehnter Art und manifestiert sich bereits in jungen Jahren. Dagegen bedingen *TNNT2* Mutationen nur eine geringe bis subklinische Ausbildung der linksventrikulären Hypertrophie, aber dafür gehen sie mit einer hohen Inzidenz des plötzlichen Herztodes, besonders bei jungen Männern, einher. Dem gegenüber stehen Mutationen im α -Tropomyosin und *MYBPC3*. Diese sind sehr oft mit einer geringen Penetranz, milder Hypertrophie und einer niedrigen Inzidenz des plötzlichen Herztodes verbunden [Marian et al. (1995), Moolman et al. (1997), Watkins et al. (1995a), Charron et al. (1998)].

Die Größe der in den Studien für Genotyp-Phänotyp Korrelationen beobachteten Familien, die kleine Anzahl der Familien mit gleichen Mutationen, die Variabilität der phenotypischen Expression von HCM innerhalb einer Familie und der Einfluss modifizierender Gene z.B. ACE-Polymorphismus und nicht-genetische Faktoren limitieren den Nutzen und die daraus gezogenen Aussagen der Genotyp-Phänotyp-Studien. Daraus folgernd ergibt sich, dass kein spezifischer klinischer Phänotyp Mutations-spezifisch verursacht wird und somit eine große klinische, elektrokardiographische und echokardiographische Variabilität nebeneinander existiert. Es wird trotzdem allgemein angenommen, dass Polymorphismen den Phänotyp der HCM beeinflussen, im Besonderen die Ausprägung der myokardialen Hypertrophie und das Risiko am plötzlichen Herztod zu versterben [Marian et al. (2001)].

4.2. Troponin T als Krankheitsgen für HCM

Das in dieser Studie betrachtete und von der prozentualen Verteilung dem *MYH7* und *MYBPC3* folgend ursächlich für HCM verantwortlich zu sein, ist das kardiale Troponin T, die an das α -Tropomyosin bindende Untereinheit des heterotrimeren Troponinkomplexes. Bei der Steuerung der Interaktion von Aktin und Myosin im Rahmen des Querbrückenzyklusses wirkt Troponin T mit Troponin C und I und α -Tropomyosin in Abhängigkeit von Calcium regulierend. In unterschiedlichen Untersuchungen an Personen mit HCM konnten bis heute 27 Veränderungen

innerhalb der DNA-Sequenz des *TNNT2* identifiziert werden. Im allgemeinen handelt sich bei Troponin T Mutationen um Missense oder Punktmutationen sowie zwei Deletionen und einer Spleiss-Variante. Die molekularbiologischen Krankheitsmechanismen werden in zwei möglichen Theorien diskutiert. Die dominant-negative Wirkung von Mutationen ist diese, dass trotz der Mutation ein funktionstüchtiges Protein gebildet wird, welches aber die Struktur oder die Wirkungsweise des Sarkomers beeinflusst. Die Interaktion mit benachbarten Proteinen und die Stoichiometrie wird stark beeinflusst. Das veränderte Protein wirkt sich somit auf die Gesamtfunktion der kontraktile Einheit aus [Watkins et al. (1996)]. Handelt es sich um Deletions-, Insertionsmutationen und Mutationen in der Nähe von Spleiss-Akzeptor sowie Spleiss-Donor-Stellen, führen diese nicht zu veränderten Proteinen. Eine Bildung eines Proteins kommt gar nicht erst zu stande bzw. ein Einbau ins Sarkomer erfolgt nicht. Dieses führt im Weiteren zu einem schnellerem Abbau und einem Mangel an funktionstüchtigem Protein (Haploinsuffizienz) [Redwood et al. (1999)].

Obwohl das Ausmaß der kardialen Hypertrophie bei Mutationen im kardialen Troponin T Gen geringer ausgeprägt ist als bei Mutationen in anderen Kandidatengenen, zeigen die betroffenen Individuen ein erhöhtes Risiko für den plötzlichen Herztod. Die Mortalitätsrate liegt vergleichsweise hoch wie bei einigen Mutationen in der schweren Kette des Myosin Gens [Watkins et al. (1995a)].

4.3. Patientengut

In die Mutationssuche mittels der Single-strand conformation polymorphism-(SSCP)-Analyse im kardialen Troponin T Gen wurden insgesamt 63 nicht verwandte Patienten mit HCM eingeschlossen. Die Diagnose der Patienten basierte auf Klinik (Ausschluss anderer Hypertrophieursachen) nach international anerkannten Kriterien (Literatur), 24h-EKG, Echokardiographie (LVH Septum > 13 mm) und invasiver Methodik wie Angiographie. Patienten, bei denen bereits eine Myektomie durchgeführt wurde, wurden unabhängig von echokardiographischen Kriterien akzeptiert. Im Vergleich dazu wurden noch 2 weitere Kollektive untersucht. Dieses waren 48 Patienten des gleichen Krankenhauses mit dilatativer Kardiomyopathie (DCM) und 46 Blutspender. Die klinischen Daten, soweit zugänglich, wurden zuvor für eine andere Promotionsarbeit gesammelt. In den Jahren 1996-1998 wurden die Daten

noch mal aktualisiert und für die diese Arbeit spezifiziert.

Mutationsanalysen in einem Kandidatengen sollten die Gesamtanzahl des Probandenkollektives beachten, um Allelfrequenzen über 5% überhaupt zu erfassen. Die Größe eines Kollektives sollte daher eine Mindestanzahl von ca. 80 Probanden nicht unterschreiten. Die Größe in dieser Arbeit ausgewählten Patientenkollektive lag bewusst unter dieser Mindestanzahl. Die sehr zeit- und materialaufwendige Durchführung der Primer-Optimierung und Etablierung der einzelnen Nachweismethoden war hierbei der limitierende Faktor. Daher ist hier kritisch zu betrachten, ob alle auftretenden Mutationen innerhalb des untersuchten Genabschnittes auch wirklich erfasst worden sind. In nachfolgenden Studien basierend auf den Grundlagen und Methoden dieser Arbeit und Daten der Arbeitsgruppe konnte an insgesamt 108 konsekutiven Patienten mit HCM ein erweitertes Mutationsscreening durchgeführt werden. Hierbei wurden noch 2 weitere Varianten (IVS6 -29 C/G, IVS14 +27 G/C) im *TNNT2* entdeckt. Es handelt sich um seltene Mutationen [Erdmann et al. (2003)]. Daraus lässt sich schließen, dass bei erhöhten Patientenzahlen weitere Varianten zu identifizieren wären.

4.4. Methodik zur Mutationssuche

Zur Erfassung genetischer Varianten im *TNNT2* ging die Polymerase-Kettenreaktion voraus. Diese ermöglicht es, eine ausreichend große Kopienzahl des zu untersuchenden DNA-Abschnittes zu gewinnen. Die PCR stellt heutzutage eine schnelle und gut etablierte Standardmethode dar. Dennoch unterliegt sie durch die Verwendung der DNA-Polymerase einer Fehlerinkorporationsrate von Nukleotiden, die insgesamt zu einer Sequenzabweichung gegenüber dem original DNA-Abschnitt führen und somit unter Umständen die Ergebnisse sich anschließender Methoden wie der SSCP-Analyse verfälschen können. In der Literatur angegebene Fehlerinkorporationen liegen bei 10.000 Basenpaaren zu einem Fehlereinbau, d.h. die in dieser Arbeit verwendete *Taq*DNA-Polymerase hat eine Fehlerrate von 1×10^{-4} bis zu $< 8 \times 10^{-5}$ pro Basenpaar [Barnes (1994)].

Der Erfolg der Mutationssuche und somit die Sensitivität der Methode basiert ebenfalls auf den Auswahlkriterien für die Wahl eines Primers. Somit sind ein GC-Gehalt zwischen 40-60 %, eine Schmelztemperatur von 56-69°C, eine geringe Sekundärstrukturbildung und 3'-Selbst-

Komplementarität wichtig für die Güte des Ergebnisses entscheidend. Des Weiteren sollen die einzelnen Primer eine Länge von 18-21 Nukleotiden nicht überschreiten. Ihre Lage wurde jeweils im 5'- und 3'- des nicht kodierenden Bereiches (Intron) der zu amplifizierenden proteinkodierenden DNA-Teilsequenz (Exon) des kardialen Troponin T Gens gewählt, dieses gewährleistete eine vollständige Untersuchung der möglichen Varianten im Exon-Bereich und des eingeschlossenen Intron-Abschnittes. Die zu amplifizierende Fragmentgröße sollte 150-300 Bp betragen, um im optimalen Sensitivitätsbereich der PCR-SSCP-Analyse zu liegen. So lassen sich 70-97% der Mutationen in PCR-Fragmenten < 300 Bp Länge detektieren [Grompe (1993), Hayashi et al. (1993)].

Die in dieser Arbeit gewählte Single-strand conformation polymorphism-(SSCP)-Methode ist eine schnelle und effiziente Analyse mit geringem Kosten- und Materialaufwand große Patientenkollektive und auch größere Genabschnitte auf genetische Varianten hin zu untersuchen. Die Sensitivität der PCR-SSCP-Analyse hängt nicht nur von der PCR-Fragmentgröße von < 300 Bp ab, sondern ist durch unterschiedliche Methodik stark variabel. So führen veränderte Elektrophoresebedingungen und die Zusammensetzung des Polyacrylamidgeles zu einer Sensitivitätssteigerung. Die Wahl zweier abweichender Umgebungstemperaturen von Raumtemperatur und 4°C führt zu einem verändertem Laufverhalten durch das Polyacrylamidgel und somit zu einem veränderten Laufmuster, welches bei einigen Varianten dieser Arbeit erst zu einer Detektion führte. Ebenso liegt die höchste Sensitivität bei der Verwendung von Polyacrylamidgelen mit einer Gelkonzentration von $\geq 8\%$ und einem Acrylamid:Bisacrylamidanteil von $\geq 37,5:1$ [Orita et al. (1989), Hayashi et al. (1993), Glavac et al. (1993)].

Somit kann zusammenfassend in dieser Arbeit die PCR-SSCP-Analyse als eine adäquate Nachweismethode genetischer Varianten angesehen werden. Insgesamt kann unter Berücksichtigung des oben genannten von einer hohen Sensitivität bei der Mutationssuche im kardialen Troponin T ausgegangen werden.

Eine sehr neue Methode scheint die denaturierende hochauflösende Flüssigkeitschromatographie (DHPLC) zu sein. Sie wurde in dieser Arbeit nicht benutzt, aber in der Arbeitsgruppe, aus der diese Arbeit stammt. Im Vergleich DHPLC mit der SSCP-Analyse konnte bei beiden Methoden eine hohe Sensitivität von 95-100% und eine Spezifität von 100%

ermittelt werden. Es konnte weiter festgestellt werden, dass die SSCP-Analyse und die DHPLC eine 92% Konkordanzrate haben, um Mutationen in Kandidatengen zu untersuchen. Insgesamt war die DHPLC zur Untersuchung neuer Fragmente geeignet, wobei die SSCP-Analyse etwas sensitiver war [Ellis et al. (2000)].

Nach abgeschlossener systematischer Variantensuche mittels PCR-SSCP-Analyse jedes einzelnen Amplifikates des kardialen Troponin T Gens erfolgte nun die Identifizierung der unterschiedlichen Bandenlaufmuster durch die Sequenzierungsmethode nach Sanger. Bei der enzymatischen DNA-Sequenzierung besteht das Prinzip darin, die Synthese des 5'-nach 3'-Stranges des zu sequenzierenden DNA-Abschnittes basenspezifisch abzubrechen. Die dadurch entstehenden unterschiedlich langen DNA-Fragmente spiegeln die Position des jeweiligen endständigen Nukleotids wieder. Daraus kann die Basenfolge des untersuchten DNA-Abschnitts ermittelt werden. Die Direktsequenzierung von PCR-Produkten bietet den Vorteil einer 100% Detektionsrate bei der Mutationssuche. Sie ist aber eine sehr teure, technisch aufwendige und eine Methode mit großem zeitlichen Aufwand. Daher ist sie bei der Untersuchung von großen Kollektiven und langen Genabschnitten als Erstmethode nicht geeignet. In dieser Arbeit wurde sie nach der jeweiligen fragmentspezifischen PCR-SSCP-Analyse und als Bestätigungsmethode angewandt.

Wie oben erwähnt, kann es im Rahmen der PCR-SSCP-Analyse durch die Verwendung der DNA-Polymerase zu einer Fehlerinkorporationsrate von Nukleotiden, die insgesamt zu einer Sequenzabweichung gegenüber dem original DNA-Abschnitt führen, kommen. Deshalb wurde für jede einzelne detektierte Variante eine Nachweismethode (Heteroduplex, RFLP, ACRS, Kontrollsequenzierung) zur unabhängigen Bestätigung etabliert. Die Heteroduplex-Analyse bietet z.B. den Vorteil auch Einzelbasenaustausche, kleinere Deletionen und Insertionen gut abzubilden. Die Ausbildung des Heteroduplexes ist eine Hybridbildung zwischen mutierter DNA und Wildtyp-DNA. In der gelelektrophoretischen Auftrennung wandern die Heteroduplexe langsamer durch das Gel als die Homoduplexe. Die Durchführbarkeit der Methode ist sehr einfach und schnell. Die Sensitivität liegt mit 80-90% sehr hoch [Nagamine et al. (1989), White et al. (1992)].

Insgesamt wurde bei allen in dieser Arbeit verwendeten Methoden durch die Anfertigung von neuen PCR-Amplifikaten, durch das Überprüfen der einzelnen Ergebnisse nach erneuter PCR-

SSCP-Analyse und durch die Durchführung aller Methoden nach laborinternen Standardverfahren die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse sichergestellt. Dieses reduzierte auch die untersucherbedingten möglichen Fehler. Durch die Verwendung unterschiedlicher und örtlich getrennter Arbeitsplätze wie z.B. von Prä-zu Post-PCR wurde die Reinheit der Proben noch zusätzlich sichergestellt. Die Methodik dieser Arbeit wurde nach gültigen Laborstandards akkreditiert und kann somit auch als klinisches Diagnostikum benutzt und interpretiert werden.

4.5. Mutationen, seltene Varianten und Polymorphismen im *TNNT2*

4.5.1. Mutationen

4.5.1.1. Arg278Pro

Eine bislang nicht beschriebene Mutation bei einem Patienten mit hypertropher obstruktiver Kardiomyopathie (Indexpatient 100, Herzkatheter 1987, Sept. 24mm, HW 11 mm, Sept./HW: 2,18, Gradient 28 mmHg) konnte in unserem Kollektiv von 63 HCM-Patienten ermittelt werden. Sie ließ sich sowohl bei Raumtemperatur und 4°C in der SSCP-Analyse nachweisen. Durch Klonierung des aberranten PCR-Produktes und anschließender DNA-Sequenzierung wurde im Exon 16 des kardialen Troponin T Gens eine G→C Transition an Position 12 (G833C) identifiziert. Aufgrund dieser Substitution kommt es zu einem Aminosäureaustausch der positiven Aminosäure Arginin (CGC) zu der neutralen AS Prolin (CCC) im Kodon 278.

Einige Familienmitglieder konnten ebenfalls untersucht werden. So konnte die Variante Arg278Pro bei zwei Töchtern des Patienten nachgewiesen werden. Der ebenfalls untersuchte Sohn war negativ. Auf Grund der griechischen Herkunft der Familie und des nur sehr kurzen Aufenthaltes der Kinder in Deutschland ergab sich nicht die Möglichkeit einer intensiven kardiologischen Diagnostik.

In weiterführenden Untersuchungen der Arbeitsgruppe konnte in insgesamt 108 konsekutiven HCM-Patienten, 48 DCM-Patienten und 46 Probanden der Blutbank kein weiterer Mutationsträger für die Variante Arg278Pro ermittelt werden [Erdmann et al. (2003)].

Die von uns identifizierte Variante Arg278Pro befindet sich in der carboxy-terminalen Domäne des kardialen Troponin T Gens (Kodon 188-288). Der Austausch bewirkt eine

Ladungsänderung von positiv zu neutral. Dieser Bereich ist durch die überwiegend sich hier befindenden positiven Aminosäuren positiv geladen. Im Gegensatz dazu ist der erweiterte N-terminale Schwanzbereich (Kodon 1-187) besonders im Kodonbereich 1-59 negativ geladen. Der C-terminale Bereich ist ein Ca-abhängiger Abschnitt der inhibitorischen Regulation des Troponin-Tropomyosin auf die Aktin-Myosin-Interaktion. Zusätzlich befindet sich nur 2 Kodons weiter eine Phosphorylierungsstelle der Proteinkinase-C an Position 280, die nur spezifisch für die kardiale Isoform von Troponin T ist. Durch die Phosphorylierung wird die Affinität des Troponin T zum Aktin-Tropomyosin-Komplex geschwächt und es induziert eine Abnahme der Freisetzungsrates von Reaktionsprodukten des aktiven Myosinbereiches [Filatov et al. (1999), Noland et al. (1993)]. Weitere Studien belegen die Wirkung dieses Bereiches auf die Interaktion mit Troponin I und C, welche in ihrer Ca-abhängigen Funktion auf die Aktin-Myosin-Interaktion verändert werden [Takahashi-Yanaga et al. (2001)].

An gleicher Position identifizierte Watkins et al. (1995a) einen Aminosäureaustausch Arg278Cys, für die eine krankheitsverursachende Wirkung angenommen wird, weil 1. sie in allen Familienmitgliedern gefunden wurde, 2. sie nicht in 100 weiteren normalen, nicht verwandten Personen gefunden wurde, 3. die Errechnung des Lod score die Verbindung von HCM zu Mutation ergab und 4. der Genabschnitt hoch konserviert innerhalb aller bekannten kardialen Troponin T Sequenzen ist. Jin et al. (1992) beschreibt in seiner Arbeit über die kardiale Troponin T Sequenz der Ratte, dass die Exonabschnitte 2-6 wenig konserviert und die Exonbereiche 7-16 hoch konserviert sind. Daraus ergibt sich die Annahme, dass sich strukturelle oder funktionelle Konsequenzen ergeben.

Die Mutation Arg278Pro konnte bei 3 von 2 Kindern des Indexpatienten 100 gefunden werden. Die beiden Mutationsträgerinnen waren die Töchter des betroffenen Patienten. Über die Töchter konnten keine klinischen Werte über mögliche Hypertrophiezeichen oder weiteren klinischen Parameter für HCM erbracht werden. Das Alter bei Untersuchung lag bei 22 und 19 Jahren. In klinischen Studien konnte gezeigt werden, dass die Ausbildung der kardialen Hypertrophie meist erst nach Abschluss der Adoleszenz auftritt. Für Troponin T Mutationen gilt aber eine eher milde bis keine Hypertrophieausbildung. Daher können wir den vollen klinischen Beweis für eine krankheitsverursachende Wirkung der Mutation nicht erbringen. Aber der bei dieser Familie vorliegende dominante Vererbungsmodus spricht für die Krankheitsrelevanz. Des Weiteren beschrieb Bonne et al. (1998) bereits für alle anderen krankheitsverursachenden

Mutationen für HCM einen heterozygoten Trägermodus. Unser Patient ist ebenfalls heterozygot. Wir können daher annehmen, dass die Variante Arg278Pro krankheitsverursachend ist.

Auf Grund der oben genannten Erkenntnisse ist eine krankheitsverursachende Wirkung der Variante Arg278Pro anzunehmen. Durch die Lage zu Troponin I und C-Bindungsregionen ist eine Auswirkung auf die Funktion wahrscheinlich und durch die Interaktion der Regulatorproteine die Konformation von Troponin T verändert wird, was im Verlauf zur Hypertrophie und Ausbildung von HCM führen kann.

4.5.1.2. Lys253Arg

Im Exon 14 des *TNNT2* fand sich ein Nukleotidaustausch (A758G), der zu einem Aminosäureaustausch von Lysin (AAG) zu Arginin (AGG) an Position 69 führt. Hierbei kommt es zu keiner Ladungsänderung durch den AS-Austausch. Die Patienten mit hypertropher Kardiomyopathie waren alle homozygot für die Variante AAG. In den mituntersuchten beiden Vergleichskollektiven wurden 2 DCM-Patienten und ein Patient aus der Kontrollgruppe als heterozygote Anlagenträger identifiziert. Niemand war homozygot für die Variante AGG. Die 3 Mutationsträger sind nicht miteinander verwandt.

Wie oben bereits erwähnt, ist die carboxy-terminale Region des kardialen Troponin T Gens für die Ca-abhängige Funktion und Interaktion entscheidend. Die von uns identifizierte Variante Lys253Arg ist ebenfalls in diesem Bereich zu finden. In der primären Struktur von Troponin T befinden sich 2 Stellen 205-255 und 155-205, die durch ihre Eigenschaft charakterisiert sind, alpha-helikale Gebilde zu formen und hydrophobische Wiederholungen beinhalten. Bindungsstellen für Troponin I an Troponin T liegen in den Kodonbereichen 152-175, 176-230 und 202-259. Eine ganz besondere Position ist der Bereich um Kodon 243-259 oder 228-259. Hier befindet sich die 2. Bindungsstelle von alpha-Tropomyosin an Troponin T. In diesem Areal bindet kein weiteres Molekül aus dem Troponinkomplex. Es wird angenommen, dass Troponin T mit seinen Partnern Tropomyosin und Troponin I in Form von triple coiled-coil Strukturen interagiert. Troponin C bindet im Bereich 159-259 oder 176-230 [Filatov et al. (1999)].

Insgesamt wird vermutet, dass durch einen Aminosäureaustausch mit resultierendem Ladungswechsel, wie das bei der Variante Arg278Pro der Fall ist, dieses für die Ausbildung der Kardiomyopathie von Bedeutung sein kann [Anan et al. (1994)]. Nicht nur durch den Ladungswechsel an sich, sondern auch durch einen Aminosäureaustausch mit Wechsel der Aminosäureseitengruppe, wie dass bei der Variante Lys253Arg der Fall ist, verändert sich die Konformation eines Proteins. Eine normal vorliegende Proteinstruktur ist nicht mehr möglich. Zuvor bestehende Interaktionen mit anderen Aminosäuren, die weiter entfernt liegen, ist nicht mehr gegeben.

Die dilatative Kardiomyopathie ist eine myokardiale Erkrankung, die mit einer Volumenzunahme besonders der Herzkammern, aber auch der Vorhöfe einhergeht. Durch erkrankte und im Verlauf durch untergegangene Myozyten bildet sich nur eine geringe Hypertrophie aber vor allem interstitielle und perivaskuläre Fibrose aus. Des Weiteren zeigen sich mikroskopisch Einzelzellnekrosen ohne für die HCM typischen Strukturverlust (disarray). Daraus resultiert eine veränderte Physiologie im Rahmen der Kraftübertragungswege innerhalb des Sarkomers mit führender systolischer Funktionsstörung, was mit der Zeit zum klinischen Vollbild der DCM führt [Towbin et al. (1999)]. Die Prävalenz der Erkrankung wird auf 36.5 pro 100000 Individuen geschätzt [Cohn et al. (1997)]. Sie ist 2-3 Mal häufiger die Ursache für die Herzinsuffizienz als HCM. 75% sind nicht familiärer Ursache wie toxisch, ischämisch, infektiös (viral) oder infiltrativ. 25% sind familiärer Ursache. Die 5 Jahres-Mortalität betrifft 75% der Erkrankten. Die Klinik zeichnet sich in den meisten Fällen durch Linksherzinsuffizienz, frühe Belastungsmüdigkeit, körperliche Schwäche, systemische oder pulmonale Embolien sowie Herzrhythmusstörungen aus. In weiteren Studien konnte belegt werden, dass DCM-Patienten mit idiopathischer Form der DCM zu 25-30% eine Genmutation vererbt bekommen haben [Grunig et al. (1998)]. Dabei wurde besonders in Studien in großen Familien der autosomal-dominante Vererbungsmodus gesehen. Aber auch autosomal-rezessive, x-chromosomal und mitochondriale Wege konnten ermittelt werden. In der nachfolgenden Tabelle 19 sind die bekannten Genorte, der Vererbungsmodus und das zugehörige krankheitsverursachende Gen aufgelistet.

Genort	Vererbungsmodus	Krankheitsverursachendes Gen
1q32	AD	Kardiales Troponin T
2q31	AD	Titin
5q33-34	AD	Delta-Sarkoglykan
6q12-16	AD	?
9q13-22	AD	?
14q11	AD	β -Myosin schwere Kette
15q14	AD	Kardiales Aktin
15q22.1	AD	α -Tropomyosin
10q21-23	AD	?
1p1-q21	AD	Lamin A/C
2q14-q22	AD	?
3q22-25	AD	?
6q23	AD	?
2q35	AD	Desmin
6q23-24	AD	?
1q42-43	AD	Kardialer Ryanodine Rezeptor
2q32.1-32.3	AD	?
3p25	AD	Caveolin-3
10p12-14	AD	?
14q12-22	AD	?
14q23-24	AD	?
6p24	AR	Desmoplakin
17q21	AR	Plakoglobin
Xp21	X	Dystrophin

Tab. 19: Genorte und krankheitsverursachende Gene der dilatativen Kardiomyopathie [angelehnt an Schönberger et al. (2001)]. AD: autosomal-dominant. AR: autosomal-rezessiv. X: X-chromosomal. ?: Gen nicht bekannt, aber DCM bestätigt.

In den letzten Jahrzehnten ist die Kenntnis über die genetische Ursache kardiovaskulärer Erkrankungen in unterschiedlichen Studien belegt worden [Hollman et al. (1960), Pare' et al. (1961)]. Krankheitsverursachende HCM-Gene sind das kardiale β -Myosin (*MYH7*, 14q12) [Jarcho et al. (1989)], Troponin T (*TNNT2*, 1q32), α -Tropomyosin (*TPM1*, 15q22), das Myosinbindungsprotein C (*MYBPC3*, 11p11.2) und andere [Thierfelder et al. (1993), Watkins

et al. (1993), Carrier et al. (1993)]. Diese Gene kodieren ausnahmslos für Proteine, die direkt oder indirekt als „Motorproteine“ oder als Kontrollfaktoren der Motilität der dünnen und dicken Filamente der Herzmuskulatur beteiligt sind. Dies führte zu der allgemeingültigen Definition, dass HCM eine Erkrankung des Sarkomers ist [Thierfelder et al. (1994)]. In neueren Studien konnten nun auch Mutationen, die mit der dilatativen Kardiomyopathie assoziiert sind, gefunden werden. So konnten die Mutationen Ser532Pro und Phe764Leu, die zu einem Basenaustausch in der schweren Kette des kardialen β -Myosins führen und eine Deletion Lys210del im kardialen Troponin T Gen identifiziert werden. Alle 3 Mutationen führen zu autosomal-dominant vererbter dilatativer Kardiomyopathie mit einem frühen Beginn der ventrikulären Dilatation (Durchschnittsalter bei Diagnosestellung 24 Jahre) [Kamisago et al. (2000)]. So wird angenommen, dass durch die Troponin T Mutation Calcium-abhängige Interaktionen zwischen Troponin T und C beeinflusst werden und somit im weiteren die Aktin-Myosin-ATPase-Aktivität in ihrer Funktion gestört wird. Was sich in einer reduzierten Energiebereitstellung für den Querbrückenschlag auswirkt, welches auch für die Mutationen im kardialen β -Myosin gilt [Schönberger et al. (2001)].

Fujino et al. (2001) untersuchte in 140 japanischen Patienten mit hypertropher Kardiomyopathie den Langzeitverlauf dieser Erkrankung bei Vorliegen einer Arg92Trp Mutation. Dabei wiesen 10 Probanden aus zwei verschiedenen Stammbäumen diese Mutation auf. In der klinischen Untersuchung hatten 3 DCM kennzeichnende Merkmale, 5 wiesen eine asymmetrische Septumhypertrophie mit normaler systolischer Funktion auf und 1 Proband war Mutationsträger, der aber die klinischen Kriterien für DCM nicht erfüllte. In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass die Arg92Trp Mutation eine hohe Auftretensrate 10/140 HCM-Probanden aufweist, mit geringer kardialer Hypertrophie und mit einem frühen Verlauf zur dilatativen Kardiomyopathie einhergeht.

In neueren Studien konnten in den letzten Jahren zusätzlich zur genetischen Ursache der Erkrankung belegt werden, dass bestimmte Umwelteinflüsse die DCM in ihrer Ausbildung und Krankheitsform beeinflussen. Im Besonderen wurden kardiotope Viren wie Parvovirus B19, Humanes Herpes Virus 6, Influenza A/B und andere in Myokardbiosien von DCM-Patienten nachgewiesen. Zum Teil konnte eine akute Virusinfektion in der Krankheitsgeschichte nicht belegt werden, so dass auch bei einem hohen Prozentsatz der Erkrankten, von einer „stummen“ Infektion auszugehen ist. Dies zeigt die hohe Varianz innerhalb der Erkrankung. Zukünftige

Untersuchungen über die molekulargenetischen Pathomechanismen der DCM sollten eine genaue klinische Charakterisierung in Kombination molekulargenetischer Daten als auch umweltbeeinflussende Faktoren (Noxen, Viren) in die Beurteilung der Erkrankung mit einbeziehen [Poller et al. (2005)]. Zusammenfassend könnte dieses für unsere Variante Lys253Arg bedeuten, dass auch hier eine Progression von HCM zu DCM stattgefunden hat. Oder wie ebenfalls bekannt ist, dass Mutationen in einem Gen sowohl zu einer dilatativen oder hypertrophen Kardiomyopathie führen, wobei hier die Mechanismen noch nicht gänzlich geklärt sind [Gomes et al. (2004)].

Wie bereits erwähnt, beschreibt Jin et al. (1992), dass die Exonabschnitte 7-16 hoch konserviert sind. Die Lys253Arg Variante liegt im Exon 14. Im Homologievergleich der Variante Arg278Pro und Lys253Arg zwischen den Proteinsequenzen des kardialen Troponin T und verschiedenen Spezies wie Schaf, Rind, Ratte, Maus und Huhn ergibt sich ein hoher Übereinstimmungsgrad. Daraus ergibt sich die Annahme, dass Mutationen in diesem Bereich zu strukturellen oder funktionellen Konsequenzen führen.

Auf Grund der oben genannten Erkenntnisse ist eine krankheitsverursachende Wirkung der Variante Lys253Arg anzunehmen. Obwohl keine Ladungsänderung entsteht, kann durch die Lage zu wichtigen Interaktionspositionen zwischen Troponin T zu Troponin I und C sowie zu alpha-Tropomyosin ein Effekt auf die Funktion und eine Wirkung auf die Interaktion von Troponin T mit seinen Bindungspartnern in diesem Bereich nicht ganz ausgeschlossen werden.

4.5.2. Seltene Varianten

Bei der SSCP-Analyse von Exon 16 konnten 2 Varianten in der untranslatierten Region ermittelt werden. Hierbei handelt es sich um die Variante 3'UTR + 6 C/T (Nukleotidposition 180) und die Variante 3'UTR + 67 G/A (Nukleotidposition 179). Bei beiden handelt es sich jeweils um einen Einzelbasenaustausch mit einer geringen Inzidenz. Der Einzelbasenaustausch C zu T konnte insgesamt nur bei 5 Probanden des Gesamtkollektives n = 157 gesehen werden. Alle waren heterozygot. Die Verteilung innerhalb der Kollektive war annähernd gleich mit HCM = 1, DCM = 2 und Kontrollen = 2. Eine ähnliche Verteilung war bei der Variante 3' UTR + 67 G/A zu sehen. Hier waren 3 HCM sowie 1 DCM Patient und 1 Proband des

Kontrollkollektivs heterozygot. Durch die Lage in der untranslatierten Region des kardialen Troponin T Gens, das geringe Auftreten (ca. 3%) der beiden Varianten innerhalb des Gesamtkollektives sowie die annähernd gleiche Verteilung in allen 3 Kollektiven ist eine krankheitsverursachende Wirkung nicht wahrscheinlich.

4.5.3. Polymorphismen im *TNNT2*

4.5.3.1. Ser69Ser

Im Exon 8 des kardialen Troponin T konnte eine Laufmusterabweichung in der SSCP-Analyse durch den Primer *ctntex 8F/R* neu identifiziert werden. Bei dieser Variante handelt es sich um einen G zu A Austausch im Exon 8 an Position 4. Es kommt es zu keiner Änderung der Aminosäuresequenz (Ser zu Ser). Das Basentriplett TCA konnte nur bei einem Patienten des HCM-Kollektivs gesehen werden. Im Vergleichskollektiv trat diese Variante nicht auf. 48 HCM-, 43 DCM-Patienten und 41 Kontrollen konnten für das Triplett TCG identifiziert werden. In heterozygoter Form konnte die Variante bei insgesamt 24 Probanden nachgewiesen werden, wobei sich diese auf 14 HCM-, 5 DCM-Patienten und 5 Kontrollen verteilte.

Bei der Ser69Ser Variante handelt es sich somit um eine stumme Variante. Diese können infolge der Degeneration des genetischen Tripletcodes entstehen. Mehrere verschiedene Kodons, die sich an der dritten Basenposition unterscheiden kodieren für eine Aminosäure. Die dritte Position eines Triplets ist sehr variabel im Vergleich zu Position eins und zwei. Man nennt sie daher auch „wobble-base“.

In jeder Spezies ist die Häufigkeit eines bestimmten Aminosäuretripletts unterschiedlich verteilt. Bei der Translation korreliert die Menge der tRNA mit dem Vorkommen der unterschiedlichen Kodons. Unterschiedliche Aminosäuretripletts können, wie oben bereits genannt, das gleiche Kodon bilden. Daraus ergibt sich, dass das Triplett mit dem prozentual häufigeren Vorkommen gegenüber dem prozentual geringeren Triplett vermehrt in den kodierenden Bereich eingebaut wird. Hierfür wurde der Ausdruck „codon usage bias“ geprägt [Gouy et al. (1982)]. Die mit dem Internetprogramm

([http://www.kazusa.org.jp/codon/cgi-bin/showcodon.cgi?species=Homo+sapiens+\[gbpri\]](http://www.kazusa.org.jp/codon/cgi-bin/showcodon.cgi?species=Homo+sapiens+[gbpri]))

ermittelten Häufigkeiten für das Triplet TCG sind 4,5% und für TCA 11,9%. Dabei wird ein prozentual weniger häufiger vorkommendes Kodon gegen ein häufigeres ausgetauscht. Dies kann die Translationseffizienz verändern und somit kann eine synonyme Mutation einen Einfluss auf die Zusammensetzung der Proteinmenge ausüben. Nicht nur die Translationseffizienz kann durch die Verwendung bestimmter Kodons beeinflusst werden, sondern auch die Genauigkeit. Genabschnitte, die mit einer hohen Translationsgenauigkeit abgelesen werden, weisen eine deutlich spezifischere Verwendung von Kodons auf als andere Abschnitte. Fehler während der Translation würden zu schweren funktionellen Störungen auf Proteinebene führen [Akashi et al. (1994)].

Die prozentuale Verteilung der beiden synonymen Kodons TCG und TCA liegt mit 7,4 % relativ dicht beieinander. Dieses spricht nicht für einen großen Selektionsvorteil, der durch eine spezifische Verwendung eines Triplets entstehen könnte. Daraus ergibt sich wahrscheinlich auch kein Unterschied in der Translationseffizienz und –genauigkeit. In der Literatur ist bisher kein Beispiel für eine krankheitsverursachende, synonyme Mutation bekannt. Dies spricht aber nicht grundsätzlich gegen die mögliche Beteiligung von synonymen Varianten an der Krankheitsentstehung, denn möglicherweise ist in der Vergangenheit diesen Varianten nur zuwenig Aufmerksamkeit geschenkt worden.

4.5.3.2. Ile106Ile

Die gleiche Arbeitshypothese lässt sich auf die Variante im Kodon 106 des kardialen Troponin T Gens anwenden. Durch den T→C-Austausch wird kein Basenaustausch bewirkt. Heterozygot waren insgesamt 29 Patienten der HCM-Gruppe, 20 Patienten mit DCM und 21 Kontrollen. Homozygot führ das Merkmal ATC waren aus allen drei Gruppen nur 11 Personen, hingegen für das Merkmal ATT insgesamt 58.

Die Verwendungshäufigkeit der beiden Kodons ATT und ATC wurde ebenfalls aus der Datenbank nach Nakamura (2000) entnommen. Die Variante ATT findet sich in 15,8% der Kodons und das Triplet ATC in 21,6% der für Isoleucin kodierenden Sequenzen. Dieser Unterschied von nur 5,8% spricht nicht für einen Selektionsvorteil, der durch die spezifische Verwendung von einem der beiden Kodons entstehen könnte. Somit ist ein Effekt nicht

wahrscheinlich, aber auf Grund der nicht ausreichenden Studienlage über die Wirkung stummer Mutationen auf Funktion und Auswirkung kann dies nicht eindeutig ausgeschlossen werden.

4.5.3.3. Weitere Sequenzänderungen im *TNNT2*

In den Intron-Exon-Abschnitten 3, 4, 5, 9, 11 und 14 konnten ebenfalls Sequenzänderungen in der PCR-SSCP-Analyse mit anschließender Sequenzierung ermittelt werden. Hierbei handelt es sich um die in den Intronabschnitten gelegenen Varianten IVS3 –11 (CTTCT)₁/(CTTCT)₂, IVS5 –49 G/A, IVS9 –97 (CCCC/CCCC), IVS11 –32 C/A und IVS14 –33 C/T. Darunter waren eine 1-Bp Deletion und vier Einzelbasensubstitutionen im Intron. Die prozentuale Verteilung innerhalb der einzelnen Kollektive war fast gleich. Signifikante Abweichungen konnten mit dem χ^2 -Test nicht berechnet werden. Ein signifikantes Ergebnis $p \geq 0,05$ konnte nicht gesehen werden, das heißt, unsere ermittelten Werte sprechen nicht dafür, dass die Genotypen dieser Population der Hardy-Weinberg-Regel entsprechen.

Damit ist auch eine krankheitsrelevante Ursache nicht wahrscheinlich, zumal die oben genannten Varianten alle ausnahmslos in den nicht-kodierenden Bereichen ermittelt wurden.

4.6. Spezielle Diskussion

4.6.1. Ergebnisse im untersuchten Kollektiv

Basierend auf den Grundlagen dieser Arbeit wurden nachfolgend noch 45 weitere Patienten mit hypertropher Kardiomyopathie des gleichen Überweisungskrankenhauses auf Mutationen im *TNNT2* untersucht [Erdmann et al. (2003)]. Hierbei wurde die Variante Arg278Pro bei keinem weiteren HCM-Patienten aus dem Gesamtkollektiv identifiziert. 2 weitere seltene Varianten mit einer Frequenz ≤ 0.01 im Gesamtkollektiv $n= 108$ wurden ermittelt. Es handelt sich um die beiden Intronvarianten IVS6 –29C/G und IVS14 +27 G/C. Polymorphismen mit $> 1\%$ der Allele waren nicht mehr zu sehen. Keine der in der Literatur beschriebenen 27 Mutationen für Troponin T konnte in unserem Kollektiv ermittelt werden. Daraus ergibt sich die Annahme, dass die in der Literatur beschriebene prozentuale Frequenz für Mutationen im Troponin T

als krankheitsverursachend zu gelten, geringer als 15% ist. In unserem Kollektiv von 108 konsekutiven Patienten mit HCM konnte gezeigt werden, dass in den Kandidatengenen *MYBPC3* und *MYH7* 80 % der Mutationen gefunden wurden. *TNNT2*, *TPM1*, *MYL2* und *TNNT3* zusammen nur 10-15 % der zu ermittelnden Varianten aufweisen. Die Gene *MYL3*, *TTN* und *ACTC* sind mit nur ca. 5 % an der Ausbildung der hypertrophen Kardiomyopathie beteiligt. So das für Troponin T eine krankheitsverursachende Verteilung von 15 %, wie es in den Familienstudien angenommen wurde, zu hoch angelegt ist. Somit lässt sich im weiteren feststellen, dass ein Mutationsscreening mittels PCR-SSCP-Analyse zum Auffinden von sporadischen Mutationen in ca. einem Drittel der konsekutiven, nicht verwandten Probanden und bei ca. jedem 2 Patienten mit positiver Familienanamnese führt.

4.6.2. Prognostische Voraussagen

Wichtige Gesichtspunkte, die sich aus den Daten molekularer Ursachen von Krankheiten in der Kardiologie, ergeben, beziehen sich auf Forschung, Diagnose und Therapie. Die Forschung ermöglicht es, umfassende Daten über Ursachen und pathogenetische Mechanismen zu ermitteln. DNA-Analysen sind leicht durchführbar, wenn in einer Familie eines Probanden eine Mutation bereits bekannt ist. Schwieriger ist die Suche nach neuen, unbekanntem Mutationen. Die Untersuchung von Kandidatengenen wird im Verlauf das Mittel der Wahl werden. Schnelle molekulargenetische Methoden sind bereits etabliert und werden in Hinblick auf den Kosten-Zeit-Faktor noch weiterentwickelt. Wenn der Nachweis einer Mutation gelingt, bestätigt dies in den meisten Fällen die bereits klinisch erhobene Diagnose. Da aber die genetische Variabilität in der Regel zutrifft und viele krankheitsrelevante Gene noch nicht ermittelt sind, schließt der fehlende Nachweis einer Mutation eine mögliche genetische Ursache nicht aus. Zusätzlich wurde die Bedeutung von umweltbeeinflussenden Faktoren (Viren, Noxen) in den letzten Jahren bewiesen. Wie wirken sich solche Erkenntnisse auf das Management mit Betroffenen aus? Wie beeinflusst es die Therapie? Im Rahmen von genetischen Familienberatungen liegen bei einigen Erkrankungen schon viele Erfahrungen vor. Bei der hypertrophen Kardiomyopathie sind solche Erfahrungen eher sehr gering. Wird bei einem einzelnen Patienten am Anfang einer Erkrankung eine Mutation identifiziert, ist eine zuverlässige Prognose und damit auch Beratung schwierig. In Familien mit mehreren Betroffenen kann möglicherweise im Verlauf ein

„mittlerer“ Schweregrad für den Verlauf der Erkrankung abgeleitet werden. Auch zeigen einige Mutationen in einzelnen Genen einen „malignen“ oder „benignen“ Verlauf auf. Hierbei sind dann die Tiermodelle im Weiteren hilfreich. Um auf diesem Gebiet zu ausreichenden Erkenntnissen zu kommen, die auch im Umgang mit Betroffenen hilfreich sind, bedarf es noch für längere Zeit umfangreicher klinisch-genetischer „Feldforschung“ und dem Aufbau von speziellen krankheitsbezogenen, länderübergreifender Datenbanken. Möglich wäre dann auch am Ende eine Therapie zu erstellen, die aktuell nicht auf medikamentös, klinisch-therapeutischer Basis fundiert, sondern den Aspekt der Gentherapie mit einbezieht.

5. Zusammenfassung

In den letzten Jahrzehnten ist die Kenntnis über die genetische Ursache kardiovaskulärer Erkrankungen belegt worden. Die hypertrophe Kardiomyopathie, die hier in der vorliegenden Arbeit untersucht wird, ist eine weltweit vorkommende primär myokardiale Herzerkrankung mit linksventrikulärer Hypertrophie, Strukturverlust (disarray) der Myozyten sowie Myofibrillen und interstitieller Fibrose. Sie ist die häufigste Todesursache unter jungen Leistungssportlern und bedingt Mortalität und Morbidität in den höheren Altersstufen. Die klinische Progression ist sehr langsam und die Ausprägung der Symptome sehr variabel, mit dem höchsten Risiko am plötzlichen Herztod in Folge von Kammerflimmern zu versterben. Auch kommen in betroffenen Familien mit sicherem genetischen Überträgerstatus asymptomatische Verläufe vor. Sie wird in 50% der Fälle autosomal-dominant vererbt. Die genetische Ursache liegt in Genen, welche ausnahmslos für Proteine kodieren, die direkt oder indirekt als „Motorproteine“ oder an der Kontrolle der Motilität der dünnen und dicken Filamente der Herzmuskulatur beteiligt sind. Dies sind zum Beispiel die schwere Kette des kardialen β -Myosins, das Troponin T, das α -Tropomyosin, das Myosinbindungsprotein C und weitere. Dies führte zu der allgemeingültigen Definition, dass HCM eine Erkrankung des Sarkomers ist.

Im kardialen Troponin T Gen berichteten zuerst Thierfelder et al. (1994) und Watkins et al. (1995a) über Mutationen bei familiärer hypertropher Kardiomyopathie. Hierbei wurden zumeist kleinere Familien mit mehreren manifest erkrankten Personen, manchmal auch nur die Indexpatienten in den betroffenen Familien und gelegentlich auch sporadische Fälle untersucht. Annahmen zur prozentualen Verteilung der Mutationen im *TNNT2* stützen sich bisher nur auf diese aufgefundenen Familien. Die prozentuale Verteilung wird daher basierend auf diese Daten für *TNNT2* auf ca. 15-20 % geschätzt [Watkins et al. (1995a), Marian et al. (2001)]. Insgesamt konnten bis heute 27 Mutationen identifiziert werden. Die zum Zeitpunkt der Studie ausschließlich vorliegenden Ergebnisse an Familien mit hypertropher Kardiomyopathie, veranlassten uns zu untersuchen, wie häufig Mutationen im kardialen Troponin T-Gen in einem unabhängigen, konsekutiven Patientenkollektiv mit HCM eines Überweisungskrankenhauses sind.

Diese Arbeit untersuchte 63 konsekutive, nicht verwandte Patienten mit hypertropher Kardiomyopathie mit und ohne Obstruktion der Ausflussbahn auf mögliche Mutationen im *TNNT2*-Gen im Exon 2-16 incl. Exon-Intron-Grenzen mittels PCR-SSCP-Analyse. Die

Diagnose der Patienten basierte auf Klinik (Ausschluss anderer Hypertrophieursachen) nach international anerkannten Kriterien (Literatur), 24h-EKG, Echokardiographie (LVH Septum > 13 mm) und Angiographie. Patienten, bei denen bereits eine Myektomie durchgeführt wurde, wurden unabhängig von echokardiographischen Kriterien akzeptiert. Zusätzlich wurden 2 Kontrollgruppen bestehend aus 48 Personen mit dilatativer Kardiomyopathie und 46 Personen eines Normalkollektivs auf die gleichen Abschnitte hin untersucht.

Es konnten 11 genetische Varianten im Intron-Exon-Bereich 34, 6, 8, 9, 10, 12, 14, 15 und 16 identifizieren. Es fanden sich somit zwei Mutationen, die jeweils eine Aminosäuresubstitution (Arg278Pro, Lys253Arg) zur Folge hatten. Die anderen identifizierten Varianten waren zwei Einzelbasenaustausche im Exon ohne AS-Austausch (Ser69Ser, Ile106Ile), eine 1-Bp Deletion [IVS9 -97 (CCCC/CCCC)], vier Einzelbasensubstitutionen im Intron [IVS3 -11 (CTTCT)₁/(CTTCT)₂, IVS5 -49 G/A, IVS11 -32 A/C, IVS14 -33 T/C] und zwei 3'UTR-Einzelbasenaustausche (+6 C/T 3'UTR, +67 G/A 3'UTR). Die Exone 2, 5, 7, 11 und 13 zeigten keine genetische Variabilität. Der χ^2 -Test zeigte in keinem der Kollektive eine signifikante Abweichung der beobachteten von der erwarteten Genotypenhäufigkeit. Es wurde keine in der Literatur beschriebene Variante in unseren Kollektiven nachgewiesen.

Im kardialen Troponin T Gen führten zuerst Thierfelder et al. (1994) und Watkins et al. (1995a) molekulargenetische Untersuchungen durch. Die prozentuale Verteilung der Mutationen im *TNNT2* stützte sich bisher nur auf diese Daten, so dass die prozentuale Verteilung für *TNNT2* auf ca. 15-20 % geschätzt wurde. Die 11 von uns identifizierten Varianten waren bis dato noch nicht bekannt, wobei wir in unserem Kollektiv auch keine bisher beschriebene Variante ermitteln konnten. Auch durch das erweiterte Mutationsscreening der Arbeitsgruppe mit 108 HCM-Patienten [Erdmann et al. (2003)] konnten keine weiteren Varianten identifiziert werden. Daraus lässt sich schließen, dass der prozentuale Anteil der krankheitsverursachenden Wirkung von Troponin T Mutationen bei HCM noch nicht endgültig und vollständig erfasst werden kann. Es werden noch neue Mutationen durch ein erweitertes Screening folgen. Durch die erweiterte Kenntnis der Pathomechanismen werden in zukünftigen Untersuchungen genaue klinische Charakterisierungen in Kombination mit molekulargenetischen Daten als auch umweltbeeinflussende Faktoren (Noxen, Viren) in die Beurteilung der Erkrankung mit einbezogen werden, was das Therapiemanagement der Betroffenen optimiert.

6. Anhang

6.1. Verzeichnis der Tabellen

Tab. 1: Für HCM verantwortliche Gene, Gensymbol, ihre Lokalisation und Mutationen.	3
Tab. 2: Primerpaare für die SSCP-Analyse im kardialen Troponin T Gen.	18
Tab. 3: Restriktionsendonukleasen für die RFLP-Analyse.	32
Tab. 4: Primerpaar für das ACRS-Assay zur Genotypisierung der Variante AAG zu AGG an Position 69 im Exon 14.	34
Tab. 5: Restriktionsendonuklease für ACRS-Assay.	35
Tab. 6: Auswertung der SSCP-Gele von Exon 2 und Exon 34 bei Raumtemperatur (RT) und 4°C.	37
Tab. 7: Zusammenfassung der identifizierten Varianten im <i>TNNT2</i> bei Patienten mit HCM, DCM und der Kontrollgruppe.	40
Tab. 8: Beschreibung der beobachteten Genotypen der Mutation Arg278Pro (CGC/CCC) im Exons 16.	43
Tab. 9: Übersicht über die beobachteten und erwarteten Genotypen und Verteilung der Allelfrequenzen der Variante IVS3 -11 (CTTCT) ₁ (CTTCT) ₂ .	45
Tab. 10: Darstellung der beobachteten und erwarteten Genotypen und der ermittelten Allelfrequenzen der Variante IVS5 -49 G/A.	47
Tab. 11: Beobachtete Genotypen des Basenaustausches TCG zu TCA im Exon 8 an Position 4 (Ser69Ser).	49
Tab. 12: Genotyp- und Allelfrequenzenverteilung der ATT zu ATC Basensubstitution im Exon 9 an Nukleotidposition 54 (Ile106Ile).	51
Tab. 13: Zusammenfassung der beobachteten und erwarteten Genotypen und Überblick über die Allelfrequenzen der Deletion CCCCC zu CCCC im Intron 9 an Position -97.	53
Tab. 14: Genotyp und Darstellung der Allelfrequenzen der Variante IVS11 -32 C/A.	55
Tab. 15: In der Tabelle sind die beobachteten Genotypverteilungen des Nukleotidaustausches AAG zu AGG im Exon 14 an Position 69 (Lys253Arg) aufgelistet.	56
Tab. 16: Darstellung über die beobachteten und erwarteten Genotypen und Aufteilung der Allelfrequenzen des Basenaustausches T zu C im Intron 14 an Position -33.	58
Tab. 17: In der Tabelle sind die beobachteten und erwarteten Genotypen und ermittelten Allelfrequenzen der Variante +6 C/T in der 3'UTR des Exons 16 beschrieben.	60
Tab. 18: Charakterisierung der beobachteten und erwarteten Genotypen und Auflistung der Allelfrequenzen der Basensubstitution G zu A an Position +67 in der untranslatierten Region am 3' -Ende des Exon 16.	61
Tab. 19: Genorte, Vererbungsmodus und krankheitsverursachende Gene der dilatativen Kardiomyopathie.	74

6.2. Verzeichnis der Abbildungen

Abb. 1: PCR-Produkt aus Kombination der Primer von <i>cntex</i> 13 F mit <i>cntex</i> 14 R.	19
Abb. 2: Exemplarisches Gelbild verschiedener <i>TNNT2</i> -PCR-Produkte.	22
Abb. 3: Darstellung der SSCP-Analyse.	23
Abb. 4: SSCP-Analyse nach Insert-spezifischer-PCR-Amplifikation der Klone von Indexpatient 13 für Exon 16.	27
Abb. 5: Optimierungsanalyse für RFLP-Assay <i>EcoNI</i> für die Variante IVS9 -97 (CCCCC/CCCC).	33
Abb. 6: Prinzip des ACRS-Assays des Austausches AAG zu AGG an Position 69 im Exon 14.	34
Abb. 7: Lokalisation der identifizierten Ergebnisse im <i>TNNT2</i> Exon 2-16.	41
Abb. 8: Stammbaum der Familie des Indexpatienten DNA-Nr. 100.	43
Abb. 9: Homologievergleich der Variante Arg278Pro und Lys253Arg zwischen den Proteinsequenzen des kardialen Troponin T und verschiedenen Spezies.	43
Abb. 10: SSCP-Analyse HCM-Patienten, <i>SmaI</i> -Verdau, SSCP-Klone und Sequenzierungsausschnitt für <i>cntex</i> 16.	44
Abb. 11: SSCP-Analyse, Sequenzierungsausschnitt und Heteroduplexanalyse für <i>cntex</i> 34.	46
Abb. 12: SSCP-Analyse und Sequenzierungsanalyse für die Variante IVS5 -49 (G/A).	48
Abb. 13: SSCP-Analyse und Reverse-Sequenzierungsprotokoll für die Variante Ser69Ser.	50
Abb. 14: SSCP-Analyse, Reverse-Sequenzierungsanalyse und RFLP-Assay für Variante Ile106.	52
Abb. 15: SSCP-Analyse und Reverse-Sequenzierungsprotokoll Variante IVS9 -97 (CCCCC/CCCC).	54
Abb. 16: SSCP-Analyse und Sequenzierungsanalyse Variante IVS11 -32 C/A.	55
Abb. 17: SSCP-Analyse, Sequenzierungsprotokoll und <i>EatI</i> -RFLP für <i>cntex</i> 14.	57
Abb. 18: SSCP-Analyse, Sequenzierungsanalyse und <i>TspRI</i> -RFLP für IVS14 -33 T/C.	59
Abb. 19: Sequenzierungsprotokoll für die Variante +6 C/T 3'UTR.	60
Abb. 20: RFLP-Assay mit <i>BsrI</i> und Sequenzierungsanalyse +67 G/A 3'UTR.	62
Abb. 21: SSCP-Analyse für <i>cntex</i> 2 bei 4°C.	62

6.3. Abkürzungen

A	Adenin
Abb.	Abbildung
ACRS	Amplification Created Restriction Site-Assay
AF	atrial fibrillation
AgNO ₃	Silbernitrat
AICD	Automatischer interner Kardiofibrillator
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
Aqua dest.	Aqua destilare
Aqua ad inject.	Aqua ad injectabilia
ARVCM	Arrhythmogene rechtsventrikuläre Kardiomyopathie
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
Bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
Bsr I	Bacillus stearothermophilus
C	Cytosin
°C	Grad Celsius

cDNA	copy DNA
CM	Kardiomyopathie
dATP	Desoxyadenosin-5'-Triphosphat
DCM	Dilatative Kardiomyopathie
dCTP	Desoxycytosin-5'-Triphosphat
ddATP	2',3'-Dideoxyadenosin-5'-Triphosphat
ddCTP	2',3'-Dideoxycytidin-5'-Triphosphat
ddGTP	2',3'-Dideoxyguanosin-5'-Triphosphat
ddNTP	2',3'-Dideoxyribonukleotid-5'-Triphosphat
ddTTP	2',3'-Dideoxythymidin-5'-Triphosphat
dGTP	Desoxyguanosin-5'-Triphosphat
DHZB	Deutsches Herzzentrum Berlin
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (desoxyribonucleic acid)
dNTP	Desoxyribonukleotid-5'-Triphosphat
DTT	Dithiotreitol
dTTP	Desoxythymidin-5'-Triphosphat
Ear I	Enterobacter aerogenes (NEB 450)
EcoN1	Escherichia coli (NEB 441)
EDTA	Ethylendiamintetraacetylsäure
EKG	Elektrokardiogramm
ETOH	Ethanol
g	Gramm
G	Guanin
HCM	Hypertrophe Kardiomyopathie
HLP	Guanin
h	Stunde
HC1	Salzsäure Hyperlipoproteinämie
HNCM	Hypertrophe nicht obstruktive Kardiomyopathie
HNO ₃	Salpetersäure
HOCM	hypertrophe obstruktive Kardiomyopathie
HW	Hinterwand
IVS	Intron
kB	Kilobase
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
KHCO ₃	Kaliumhydrogencarbonat
LB-Medium	Luria-Bertrani-Medium
LVEDD	linksventrikulärer enddiastolischer Druck
LVESD	linksventrikulärer endsystolischer Druck
M	Molarität
mg	Milligramm
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
ml	Milliliter
Molar	molar
mol/l	Mol/Liter
mV	Millivolt
MW	Mittelwert
n	Anzahl
NaCl	Natriumchlorid
NaCO ₃	Natriumcarbonat
NaOH	Natriumhydroxid
ng	Nanogramm
NH ₄ Cl	Ammoniumchlorid
NKCM	nichtklassifizierbare Kardiomyopathie
nm	Nanometer
OD	optische Dichte
PAA	Polyacrylamid
PBS	phosphate buffered saline (phosphatgepufferte Kochsalzlösung)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
pmole	Picomol

Pos.	Position
RFLP	Restriktionsfragment-Längen-Polymorphismus
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RR	Blutdruck
RSB	Rechtsschenkelblock
RT	Raumtemperatur
SD	Standardabweichung
SDS	Sodium dodecyl Sulfate (Natrium Dodecyl Sulfat)
Sept.	Septum
SM	Schrittmacher
Sma I	Serratia marcescens Sb
SSCP	Einzelstrang-Konformationspolymorphismus
SSCP	Single-strand conformation polymorphism
SVT	supraventrikuläre Tachykardie
T	Thymin
Taq	Thermus aquaticus
TBE	Tris-Borat/EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
<i>TNNT2</i>	kardiales Troponin T Gen
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
tRNA	translatierte Ribonukleinsäure
TspRI	Thermus species R
U	Unit, Einheit
UTR	Untranslatierte Region (untranslated region)
3'UTR	Untranslatierte Region am 3'Ende
UV-Licht	ultraviolettes Licht
V	Volt
VES	ventrikuläre Extrasystolen
VT	Volumenteile
VT	ventrikuläre Tachykardie
WT	Wildtyp
X-Gal	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- β -D-Galactopyranosid
μ g	Mikrogramm
μ l	Mikroliter
μ m	Mikrometer

7. Literaturverzeichnis

Alvarez, R.; Reguero, J. R.; Batalla, A.; Iglesias-Cubero, G.; Cortina, A.; Alvarez, V.; Coto, E. (1998): ACE- and angiotensin II receptor 1 polymorphisms: association with early coronary disease. *Cardiovasc Res* 40 (2), S. 375-379

Akashi, H. (1994): Synonymous codon usage in *Drosophila melanogaster*: Natural Selection and Translational Accuracy. *Genetics* 136, S. 927-935

Anan, R.; Geve, G.; Thierfelder, L.; Watkins, H.; McKenna, W. J.; Solomon, S.; Vecchio, C.; Shono, H.; Nakao, S.; Tanaka, H. (1994): Prognostic implications of novel beta-cardiac myosin heavy chain gene mutations that cause familial hypertrophic cardiomyopathy. *J Clin Invest* 93, S. 280-285

Anderson, P. A. W.; Greig, A.; Mark, T. M.; Malouf, N. N.; Oakeley, A. E.; Ungerleider, R. M.; Alle, P. D.; Kay, B. K. (1995): Molecular basis of human cardiac troponin T isoforms expressed in the developing, adult and failing heart. *Circ. Res.* 76, S. 681-686

Barnes, W-M. (1994): PCR amplification of up to 35-kb DNA with high fidelity und yield from lambda bacteriophage templates. *Proc Natl Acad Sci Vol 91 (6)*, S. 2216-2222.

Bonne, G.; Carrier, L.; Richard, P.; Hainque, B.; Schwartz, K. (1998): Familial Hypertrophic Cardiomyopathy From Mutations to Functional Defects. *Circ Res.* 83, S. 580-593

Breitbart, R. E.; Ngyen, H. T.; Medford, R. M.; Destree, A. T.; Mahdavi, V.; Nadal-Ginard, B. (1985): Intricate combinatorial patterns of exon splicing generate multiple regulated troponin T isoforms from single genes. *Cell* 41, S. 67-82

Buddecke, E. (1989): Grundriss der Biochemie, *Walter de Gruyter Verlag, Berlin, New York*

Budowle, B.; Chakraborty, R.; Giusti, A. M.; Eisenberg, A. J.; Allen, R. C. (1991): Analysis of the VNTR locus D1s80 by the PCR followed by high-resolution PAGE. *Am. J. Hum. Genet.* 48, S. 137-144

Carrier, L.; Hengstenberg, C.; Beckmann, J. S.; et al. (1993): Mapping of a novel gene for familial hypertrophic cardiomyopathy to chromosome 11. *Nat Genet* 4, S. 311-313

Charron, P.; Dubourg, O.; Desnos, M.; Isnard, R.; Hagege, A.; Millaire, A.; Carrier, L.; Bonne, G.; Tesson, F.; Richard, P.; Bouhour, J.-B.; Schwartz, K.; Komajda, M. (1997): Diagnostic Value of Electrocardiography and Echocardiography for Familial Hypertrophic Cardiomyopathy in a Genotyped Adult Population. *Circulation* 96, S. 214-219

Charron, P.; Dubourg, O.; Desnos, M.; Bennaceur, M.; Carrier, L.; Camproux, A. C.; Isnard, R.; Hagege, A.; Langlard, J. M.; Bonne, G.; Richard, P.; Hainque, B.; Bouhour J. B.; Schwartz, K.; Komajda, M. (1998): Clinical features and prognostic implications of familial hypertrophic cardiomyopathy related to the cardiac myosin-binding protein C gene. *Circulation* 97, S. 2230-2236

Cohn J. N.; Bristow, M. R.; Chien, K. R.; Colucci, W. S.; Frazier, O. H.; Leinwand, L. A.; Lorell, E.; Moss, A. J.; Sonnenblick, E. H.; Walsh, R. A. (1997): Report of the National Heart and Blood Institute special emphasis panel on heart failure research. *Circulation* 95, S. 766

- Cuozo, M.; Krieger, J. E.; Mota, G. F.; Freitas, H. F. G.; Bocchi, E. A.; Mansur, A. J. (1999): Insertion/deletion polymorphism of the Angiotensin-I-Converting-Enzyme gene and the evolution of patients with heart failure. *Eur Heart J* 20, (abstr. 599 suppl.), S. 89
- Dianzani, I.; Camaschella, C.; Ponzone, A.; Cotton, R. G. H. (1993): Dilemmas and progress in mutation detection. *TIG, Vol. 9, NO. 12, S. 403-405*
- Drlica, K. (1984): Understanding DNA and gene cloning. *John Wiley & Sons, New York*
- Ellis, L. A.; Taylor, C. F.; Taylor, G. R. (2000): A comparison of fluorescent SSCP and denaturing HPLC for high throughput mutation scanning. *Hum Mutat Vol 15, S. 556-564*
- Erdmann, J.; Daehmlow, S.; Wischke, S.; Senyuva, M.; Werner, U.; Raible, J.; Tanis, N.; Dyachenko, S.; Hummel, M.; Hetzer, R.; Regitz-Zagrosek, V. (2003): Mutation Spectrum in a Large Cohort of Unrelated Consecutive Patients with Hypertrophic Cardiomyopathy. *Clin. Genet. Oct; Vol 64 (4), S. 339-349*
- Fananapazir, L.; Epstein, N. D. (1994): Genotype phenotype correlations in hypertrophic cardiomyopathy. Insights provided by comparisons of kindreds with distinct and identical beta-myosin heavy chain gene mutations. *Circulation* 89 (1), S. 22-32
- Fananapazir, L. (1999): Advances in Molecular Genetics and Management of Hypertrophic Cardiomyopathy. *JAMA Vol. 281, No. 18, S.1746-1752*
- Filatov, V. L.; Katrukha, A. G.; Bulargina, T. V.; Gusev, N. B. (1999): Troponin: structure, properties, and mechanism of functioning. *Biochemistry (Mosc) Sep; 64, S. 969-985*
- Forissier, J. F.; Carrier, L.; Farza, H.; Bonne, G.; Bercovici, J.; Richard, P.; Hainque, B.; Townsend, P.; Yacoub, M. H.; Faure', S.; Dubourg, O.; Millaire, A.; Hagege, A.; Desnos, M.; Komajda, M.; Schwartz, K. (1996): Codon 102 of the cardiac Troponin T gen is a putative hot spot for mutations in the familial hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation Vol 94 , No.12, December 15, S. 3069-3073*
- Fujino, N.; Shimizu, M.; Ino, H.; Okeie, K.; Yamaguchi, M.; Yasuda, T.; Kokado, H.; Mabuchi, H. (2001): Cardiac troponin T Arg92Trp mutation and progression from hypertrophic to dilated cardiomyopathy. *Clin Cardiol May, 24 (5), S. 397-402*
- Gahlmann, R.; Troutt, A. B.; Wade, R. P.; Gunning, P.; Kedes, L. (1987): Alternative splicing generates variants in important functional domains of human slow skeletal troponin T. *J. Biol. Chem. 262, S. 16122-16126*
- Geisterfer-Lowrance, A. A.; Christe, M.; Conner, D. A.; Ingwall, J. S.; Schoen, F. J.; Seidmann, C. E.; Seidmann, J. G. (1996): A mouse model of familial hypertrophic cardiomyopathy. *Science* 272, S. 731-734
- Gerull, B.; Osterziel, K.-J.; Witt, C.; Dietz, R.; Thierfelder, L. (1998): A Rapid Protocol for Cardiac Troponin T Gene Mutation Detection in Familial Hypertrophic Cardiomyopathy. *Human Mutation* 11 (2), S. 179-182
- Glavac, D.; Dean, M. (1993): Optimization of single-strand conformation polymorphism (SSCP) technique for detection of point mutations. *Human Mutation* 2, S. 404-414

- Gleichmann, U., Seggewiß, H. (1998): Klinik und Therapie der hypertrophen Kardiomyopathie. *Medizinische Klinik* 93, S. 260-267 (Nr. 4)
- Glover, D. M. (1988): DNA cloning I a practical approach. *Irl. Press, Oxford* 2. Aufl.,
- Gomes, A.; Potter, J. (2004): Molecular and cellular aspects of troponin cardiomyopathies. *Ann N Y Acad Sci* 1015, S. 214-224
- Gouy, M.; Gautier, C. (1982): Codon usage in bacteria: correlation with gene expressivity. *Nucleic Acid Res* 10 (22), S. 7055-7074
- Grompe, M. (1993): The rapid detection of unknown mutations in nucleic acids. *Nature Genetics* Vol. 5, S. 111-116
- Grunig, E.; Tasman, J. A.; Kucherer, H.; Franz, W.; Kubler, W.; Katus, H. A. (1998): Frequences and phenotypes of familial dilated cardiomyopathy. *J. Am. Coll. Cardiol.*, 31, S. 186-194
- Haliassos, A.; Chomel, J. C.; Tesson, L.; Baudis, M.; Kruh, J.; Kaplan, J. C.; Kitzis, A. (1989): Modification of enzymatically amplified DNA for the detection of point mutations. *Nucleic Acids Res.* 17, S. 3606
- Hanahan, D. (1983): Studies on transformation of escherichia coli with plasmids. *J. Mol. Biol.* 166, S. 557-580
- Hayashi, K.; Yandell, D. W. (1993): How sensitive is PCR-SSCP? *Human Mutation* 2, S. 338-346
- Hennig, W. (1998): Genetik, zweite, überarbeitete und erweiterte Auflage. *Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York*
- Herold, G. (1999): Innere Medizin. Eine vorlesungsorientierte Darstellung. *Köln*
- Hershey, A. D.; Chase, M. (1951): Genetic recombination and heterozygosis in bacteriophage, *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 16, S. 471-479
- Hollman, A.; Goodwin, J. F.; Teare, D.; Renwick, J. W. (1960): A family with obstructive cardiomyopathy (asymmetrical hypertrophy). *Br Heart J.* 22, S. 449-456
- Jarcho, J. A.; McKenna, W.; Pare', J. A.; et al. (1989): Mapping a gene for familial hypertrophic cardiomyopathy to chromosome 14q1. *N Engl J Med* 321, S. 1372-1378
- Jin, J.-P.; Huang, Q.-Q.; Yeh, H.-I.; Lin, J. J. C. (1992): Complete nucleotide sequence and structural organization of rat cardiac troponin T gene. *J. Mol Biol* 227, S. 1269-1276
- Kamisago, M.; Sharma, S. D.; DePalma, S. R.; Solomon, S.; Sharma, P.; McDonough, B.; Smoot, L.; Mullen, M. P.; Woolf, P. K.; Wigle, E. D.; Seidmann, J. G.; Seidmann, C. E. (2000): Mutations in sarcomere protein genes as a cause of dilated cardiomyopathy. *N Engl J Med* Dec 7; 343 (23), S. 1688-1696

- Lechin, M.; Quinones, M. A.; Onran, A.; Hill, R.; Yu, Q. T.; Rakowski, H.; Wigle, D.; Liew, C. C.; Sole, M.; Roberts, R. (1995): Angiotensin-I-converting-enzyme and left ventricular hypertrophy in patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation* 92 (7), S. 1808-1812
- Lin, D.; Bobkova, A.; Homsher, E.; Tobacman, L. S. (1996): Altered cardiac troponin T in vitro function in the presence of a mutation implicated in mamalian hypertrophic cardiomyopathy. *J. Clin. Invest.* Jun 15, 97 (12), S. 2842-2848
- Lindpainter, K. (1994): Genes, hypertension and cardiac hypertrophy. *N. Engl. J. Med.* 330, S. 1678-1679
- McKenna, W.; Deanfield, J.; Faruqi, A.; England, D.; Oakley, C.; Goodwin, J. (1981): Prognosis in hypertrophic cardiomyopathy: role of age and clinical, electrocardiographic and hemodynamic features. *Am J Cardiol.* 47, S. 532-538
- McKenna, W. J.; Camm, A. J. (1997): Experience from clinical genetics in hypertrophic cardiomyopathy: proposal for new diagnostic criteria in adult members of affected families. *Heart* 77, S. 130-132
- Marian, A. J.; Mares, A. J. R.; Kelly, D. P.; Yu Q. T. Abchee, A. B.; Hill, R.; Roberts, R. (1995): Sudden cardiac death in hypertrophic cardiomyopathy. Variability in phenotypic expression of beta-myosin heavy chain mutations. *Eur Heart J* 16, S. 368-376
- Marian, A. J.; Wu, Y.; Lim, D.-S.; McCluggage, M.; Youker, K.; Yu, Q.-T.; Brugada, R.; DeMayo, F.; Quinones, M.; Roberts, R. (1999): A transgenic rabbit model for human hypertrophic cardiomyopathy. *J. Clin. Invest.* 104, S. 1683-1692
- Marian, A. J.; Roberts, R. (2001): The Molecular Genetic Basis für Hypertrophic Cardiomyopathy. *J Mol Cell Cardiol* 33, S. 655-670
- Maron, B. J.; Schiffers, A.; Klues, H. G. (1999): Comparison of phenotypic expression of hypertrophic cardiomyopathy in patients from the United States and Germany. *Am J Cardiol* 83 (4), S. 626-627
- Mesnard, L.; Samson, F.; Espinasse, I.; Durand, J.; Neveux, J. Y.; Mercadier, J. J. (1993): Molecular cloning and developmental expression of human cardiac troponin T. *FEBS Lett* 328, S. 139-144
- Miller, S. A.; Dykes, D. D.; Polesky, H. F. (1988): A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 16, S. 1215
- Molkentin, J. D.; Lu, J. R.; Antos, C. L.; Markham, B.; Richardson, J.; Rassins, J.; Grant, S. R.; Olson, E. N. (1998): A calcineurin-dependent transcriptional pathway for cardiac hypertrophy. *Cell* 93 (2), S. 215-228
- Moolman, J. C.; Corfield, V. A.; Posen, B.; Ngumbela, K.; Seidman, C. E.; Brink, P. A.; Watkins, H. (1997): Sudden death due to troponin T mutations. *J. Am Coll Cardiol.* 29, S. 549-555

- Morimoto, S.; Yanaga, F.; Minakami, R.; Ohtsuki, I. (1998): Ca²⁺-sensitizing effects of the mutations at Ile-79 and Arg-92 of Troponin T in hypertrophic cardiomyopathy. *Am. J. Physiol.* 44, S. 200-207
- Mullis, K. B.; Faloona, F. A.; Scharf, S.; Saiki, R.; Horn, G.; Ehrlich, H. (1986): Specific enzymatic amplification of DNA in vitro. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 51, S. 263-273
- Nagamine, C. M.; Chan, K.; Lau, Y.-F. C. (1989): A PCR artifact: generation of heteroduplexes. *Am. J. Hum. Genet.* 45, S. 337-339
- Nakamura, Y.; Gojobori, T.; Ikemura, T. (2000): Codon usage tabulated from international DNA sequence databases: status for the year 2000. *Nucleic Acids Res* 28 (1), S. 292
- Nathans, D.; Smith, O. D. (1975): Restriction endonucleases in the analysis and restructuring of DNA molecules. *Annual Review of Biochemistry* 44, S. 273-93
- Noland, T. A., Jr; Kuo, J. F. (1993): Protein Kinase C Phosphorylation of Cardiac Troponin I and Troponin T Inhibits Ca²⁺-Stimulated MgATPase Activity in Reconstituted Actomyosin an Isolated Myofibrils, and Decreases Actin-Myosin Interactions. *J. Mol. Cell. Cardiol.*; 25, S. 53-65
- Oberst, L.; Zhao, G.; Park, J. T.; Brugada, R.; Michael, L. H.; Entman, M. L.; Roberts, R.; Marian, A. J.; (1998): Dominant-negative effect of a mutant cardiac troponin T on cardiac structure and function. *J. Clin. Invest.* 102 (8), S. 1498-1505
- Orita, M.; Iwahana, H.; Kanazawa, H.; Hayashi, K.; Sekiya, T. (1989): Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA. (Genetics)* 86, S. 2766-2770
- Orita, M.; Suzuki, Y.; Sekiya, T.; Hayashi, K. (1989): Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. *Genomics* 5, S. 874-879
- Pare', J. A. P.; Fraser, R. G.; Pirozynski, W. J.; Shanks, J. A.; Stubington, D. (1961): Hereditary cardiovascular dysplasia: a form of familial cardiomyopathy. *Am J Med.* 31, S. 37-62
- Poller, W.; Kühl, U.; Tschoepe, C.; Pauschinger, M.; Fechner, H.; Schultheiss, HP. (2005): Genome-environment interactions in the molecular pathogenesis of dilated cardiomyopathy. *J Mol Med., August* 83, S. 579-586
- Raynolds, M. V.; Bristow, M. R.; Bush, E. W.; Abraham, W. T.; Lowes, B. D.; Zisman, L. S.; Taft, C. S.; Perryman, M. B. (1993): Angiotensin-converting enzyme DD genotype in patients with ischaemic or idiopathic dilated cardiomyopathy. *The Lancet, Vol.* 342, October 30, S. 1073-1085
- Redwood, C. S.; Mollmann-Smook, J. C.; Watkins, H. (1999): Properties of mutant contractile proteins that cause HCM. *Cardiovasc Res* 44 (1), S. 20-26

- Richardson, P.; McKenna, W.; Bristow, M.; et al. (1996): World Health Organization/International Society of Cardiology Task Force on the definition and classification of cardiomyopathies. *Circulation* 93, S. 841-842
- Rigat, B.; Hubert, C.; Alhenc-Gelas, F.; Cambien, F.; Corvol, P.; Soubier, F. (1990): An insertion/deletion polymorphism in the angiotensin I-converting enzyme gene accounting for a half the variance of serum enzyme levels. *J Clin Invest.* 86, S. 1343-1346
- Rust, E. M.; Albayya, F. P.; Metzger, J. M. (1999): Identification of contractile deficit in adult cardiac myocytes expressing hypertrophic cardiomyopathy-associated mutant troponin T proteins. *J. Clin. Invest.* 103, S. 1459-1467
- Sadoul, N.; Prasad, K.; Elliot, P. M.; Bannerjee, S.; Frenneaux, M.; McKenna, W. J. (1997): Prospective Prognostic Assessment of Pressure Response During Exercise in Patients With Hypertrophic Cardiomyopathy. *Circulation* 96, S. 2987-2991
- Saiki, R.; Gelfand, D. H.; Stoffel, S.; Scharf S. J.; Higuchi, R.; Horn, G. T.; Mullis, K. B.; Ehrlich, H. A. (1988): Primer-directed enzymatic amplification of DNA with thermostable DNA polymerase. *Science* 239, S. 487-491
- Sanger, F.; Nicklen, S.; Coulson, A. R. (1977): DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, S. 5463-5467
- Schmidt, F.; Thewes, G. (1995): Physiologie des Menschen. *Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York*, 26.Aufl., S. 67-72
- Schönberger, J.; Seidmann, C. E. (2001): Many roads lead to a broken heart: The genetics of Dilated Cardiomyopathy. *Am. J. Hum. Genet.*, 69, S. 249-260
- Schulte, H. D., Gramsch-Zabel, H., Schwartzkopf, B., Gams, E. (1999): Hypertrophische Kardiomyopathie (HCM) Chirurgische versus medikamentöse Therapie. *Z Kardiol* 88, S. 163-172
- Schwartz, K.; Carrier, L.; Guicheney, P.; Komajda, M. (1995): Molecular basis of familial cardiomyopathies. *Circulation* Vol 91, No. 2, January 15, S. 532-540
- Sussman, M. A.; Lim, H. W.; Gude, N.; Taigen, T.; Olson, E. N.; Rossins, J.; Colbert, M. C.; Gualberto, A.; Wiczorek, D. F.; Molkentin, J. D. (1998): Prevention of cardiac hypertrophy in mice by calcineurin inhibition. *Science* 281 (5383), S. 1690-1693
- Sweeney, H. C.; Feng, H. S.; Yang, Z.; Watkins, H. (1998): Functional analyses of troponin T that causes hypertrophic cardiomyopathy: insights into disease pathogenesis and troponin function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, S. 14406-14410
- Takahashi-Yanaga, F.; Ohtsuki, I.; Morimoto, S. (2001): Effects of Troponin T Mutations in Familial Hypertrophic Cardiomyopathy on Regulatory Functions of Other Troponin Subunits. *J. Biochem.* Vol. 130, S. 127-131

- Tardiff, J. C.; Factor, S. M.; Tompkins, B. D.; Hewett, T. E.; Palmer, B. M.; Moore, R. L.; Schwartz, S.; Robbins, J.; Leinwand, L. A. (1998): A truncated cardiac troponin T molecule in transgenic mice suggests multiple cellular mechanisms for familial hypertrophic cardiomyopathy. *J. Clin. Invest.* 101, S. 2800-2811
- Thierfelder, L.; MacRae, C.; Watkins, H.; et al. (1993): A familial hypertrophic cardiomyopathy locus maps to chromosome 15q2. *Proc Natl Acad Sci USA* 3, S. 6270-6274
- Thierfelder, L.; Watkins, H.; MacRae, C.; Lamas, R.; McKenna, W.; Vosberg, H. P.; Seidmann, J. G.; Seidmann, C. E. (1994): α -Tropomyosin and cardiac Troponin T mutations cause familial hypertrophic cardiomyopathy: A disease of the sarcomere. *Cell* Vol 77, 701-712, June 3
- Towbin, J. A. (1998): The role of cytoskeletal proteins in cardiomyopathies. *Current Opinion in Cell Biology* 10, S. 131-139
- Towbin, J. A.; Bowles, K. R.; Bowles N. E. (1999): Etiologies of cardiomyopathy and heart failure. *Nature Med.*, 5, S. 266-267
- Vosberg, H.-P. (1998): Die genetischen Ursachen der hypertrophischen Kardiomyopathie. *Med Klin* 93, S. 252-259
- Watkins, H.; Thierfelder, L.; Hwang, D. S.; McKenna, W. J.; Seidmann, J. G.; Seidmann, C. E. (1992): Sporadic hypertrophic cardiomyopathy due to *de novo* myosin mutations. *J Clin Invest.* 90, S. 1666-1671
- Watkins, H.; MacRae, C.; Thierfelder, L.; Chou, Y. H.; Frenneaux, M.; McKenna, W.; Seidmann, J. G.; Seidmann, C. E. (1993): A disease locus for familial hypertrophic cardiomyopathy maps to chromosome 1q3. *Nat Genet* 333-337
- Watkins, H.; McKenna, W. J.; Thierfelder, L.; Suk, H. J.; Anan, R.; O'Donoghue, A.; Spirito, P.; Matsumori, A.; Moravec, C. S.; Seidmann, J. G.; Seidmann, C. E. (1995a): Mutations in the genes for cardiac troponin T and alpha-tropomyosin in hypertrophic cardiomyopathy. *N. Engl. J. Med.* 332, S. 1058-1064
- Watkins, H.; Conner, D.; Thierfelder, L.; Jarcho, J. A.; MacRae, C.; McKenna, W. J.; Maron, B. J.; Seidmann, J. G.; Seidmann, C. E. (1995b): Mutations in the cardiac binding protein-C gene on chromosome 11 cause familial hypertrophic cardiomyopathy. *Nat Genet* 11, S. 434-437
- Watkins, H. C.; Seidman, C. E.; Seidman, J. G.; Feng, H. S.; Sweeney, H. L. (1996): Expression and functional assessment of a truncated cardiac troponin T that causes hypertrophic cardiomyopathy. Evidence for a dominant negative action. *J. Clin. Invest.* 98, S. 2456-2461
- Weaver, R. F.; Hedrick, P. W. (1997): Genetics Third Edition. *Wm. C. Brown Publishers*
- White, M. B.; Carvalho, M.; Derse, D.; O'Brian, S. J.; Dean, M. (1992): Detecting single base substitutions as heteroduplex polymorphisms. *Genomics* 12, S. 301-306

8. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt, Frau Prof. Dr. Regitz-Zagrosek für die Möglichkeit diese Arbeit in Ihrer Arbeitsgruppe für experimentelle Kardiologie am Deutschen Herzzentrum Berlin, durchführen zu können. Des Weiteren danke ich ihr für die Überlassung des Themas und für die hervorragende Beratung bei der Abfassung der Arbeit. Und für die Geduld mich über diesen langen Zeitraum zu betreuen, da ich aus beruflichen Gründen die Arbeit verspätet einreiche.

Ebenso bin ich Frau PD Dr. Erdmann zu sehr großem Dank verpflichtet diese Arbeit mit ihrer allzeit engagierten und freundschaftlichen Betreuung und großartigen Unterstützung gefördert zu haben.

Allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe, im Besonderen Frau H. Meyborg, möchte ich für die kollegiale Zusammenarbeit und für die technische Unterstützung meinen herzlichen Dank aussprechen.

Frau M. Heidenreich danke ich, dass sie mir ihre klinischen Daten zur Verfügung gestellt hat.

Ich möchte Prof. Dr. Thierfelder für die Proben aus seinem Patientenkollektive danken.

Ebenfalls danke ich den Patienten des DHZB und der Blutbank, die sich für diese Studie zur Verfügung gestellt haben.

Nicht zuletzt gilt mein besonderer Dank meiner Familie, ohne deren Unterstützung mein Studium, meine Arbeit und die Anfertigung dieser Arbeit über diesen Zeitraum nicht möglich gewesen wären.

Erklärung

„Ich, Sandra Wischke, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema:
„Mutationen und Polymorphismen im kardialen Troponin T Gen bei Patienten mit hypertropher
Kardiomyopathie“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel
benutzt, ohne die Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten
dargestellt habe.“

Datum: 11.08.2008

Unterschrift: gez. Sandra Wischke