

Meinem Vater

Inhaltverzeichnis

1. Einleitung	4
1.1 Kardiomyopathien: Definition und Klassifikation	4
1.1.1 Primäre Kardiomyopathien	5
1.1.2 Sekundäre Kardiomyopathien.....	7
1.2 Hypertrophe Kardiomyopathie	9
1.2.1 Anatomische und histologische Charakteristika der HCM	10
1.2.2 Klinische Merkmale.....	11
1.2.3 Genetische Merkmale	11
1.2.4 Genotyp-Phänotyp-Korrelation.....	13
1.3 Das Sarkomer	15
1.3.1 Kontraktionsmechanismus: Aktin-Myosin-Interaktion.....	17
1.3.2 Nicht alles ist Aktin und Myosin: Das Sarkomer-Zytoskelett.....	18
1.3.2.1 Die M-Bande	18
1.3.2.2 Myomesin-, EH-Myomesin- und M-Proteinkorrelation in der M-Bande.....	20
1.3.2.3 Elektronenmikroskopie der M-Bande und M-Banden-Strukturmodelle.....	21
1.3.3 Das Protein Myomesin.....	23
1.3.3.1 Myomesin-Bindungsstellen	24
1.3.3.2 Myomesin-Isoformen	25
2. Material und Methoden	26
2.1 Klinische Evaluation	26
2.2 Genetische Analyse	26
2.2.1 DNA-Extraktion.....	27
2.2.2 Amplifizierung der Myomesin-Exons mittels Polymerase-Chain-Reaction (PCR)	29
2.2.3 Single-Strand-Conformation-Polymorphism (SSCP)	32
2.2.3.1 Verfahren der Single-Strand-Conformation-Polymorphism (SSCP)-Analyse	33
2.2.3.2 Optimierung der Single-Strand-Conformation-Polymorphism (SSCP)-Analyse	35
2.2.4 Automatische DNA-Sequenzierung	36
2.2.4.1 Polymerase-Chain-Reaction (PCR).....	37
2.2.4.2 Cycle-Sequencing.....	37
2.2.4.3 Ethylendiamintetraacetat (EDTA)-Ethanol-Fällung.....	38
2.2.4.4 Sequenzierung	38
2.2.4.5 Auswertung	38
2.2.5 Restriktionsenzymverdau.....	39
2.2.6 Agarosegelelektrophorese.....	39
2.3 Materialien	40
2.3.1 Geräte.....	40
2.3.2 Chemikalien	41
3. Ergebnisse	43
3.1 Exon 7 der Myomesin Gen-Analyse	45
3.1.1 Polymerase-Chain-Reaction (PCR)	45
3.1.2 Single-Strand-Conformation-Polymorphism (SSCP)-Analyse	45
3.1.3 Sequenzierung.....	48
3.1.4 Identifikation der Leu390Phe-Mutation bei Familie S.....	49
3.1.5 Lokalisation der Leu390Phe-Mutation in hoch konservierter Region	51
3.1.6 Mutation Leu390Phe: Klinische Befunde bei Familie S.....	51
3.1.7 Mutation Leu390Phe: Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus (RFLP), Restriktionsenzymverdau.....	56
3.1.8 Intronsche Polymorphismen im Intron 6 des <i>MYOM</i> -Gens	59
3.2 Exon 8 der Myomesin Gen-Analyse	61
3.2.1 Polymerase-Chain-Reaction (PCR)	61
3.2.2 Single-Strand-Conformation-Polymorphism (SSCP)-Analyse	61
3.2.3 Sequenzierung.....	62

3.3 Exon 9 der Myomesin Gen-Analyse.....	63
3.3.1 Polymerase-Chain-Reaction (PCR)	63
3.3.2 Single-Strand-Conformation-Polymorphism (SSCP)-Analyse	63
3.3.3 Sequenzierung	66
3.3.3.1 Polymorphismus (SNP) im Intron 8 des Myomesin-Gens	67
3.3.3.2 Polymorphismus (SNP) im Exon 9 des Myomesin-Gens	67
3.3.3.3 Mutation Arg464Trp in Exon 9 des Myomesin-Gens	68
3.3.4 Mutation Arg464Trp	69
3.3.4.1 Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus (RFLP),	69
Restriktionsenzymverdau mit MwoI und AciI.	69
3.3.4.2 Mutation Arg464Trp bei Familie mit bekannter β -myosin-heavy-chain-Arg403Trp-Mutation identifiziert	72
3.4 Exon 22 der Myomesin Gen-Analyse.....	74
3.4.1 Polymerase-Chain-Reaction (PCR)	74
3.4.2 Single-Strand-Conformation-Polymorphism (SSCP)-Analyse	74
3.4.3 Sequenzierung	75
3.5 Exon 23/24 der Myomesin Gen-Analyse	76
3.5.1 Polymerase-Chain-Reaction (PCR)	76
3.5.2 Single-Strand-Conformation-Polymorphism (SSCP)-Analyse	76
3.5.3 Sequenzierung: Polymorphismus im Intron 22 des Myomesin-Gens	78
3.6 Exon 25 der Myomesin Gen-Analyse.....	81
3.6.1 Polymerase-Chain-Reaction (PCR)	81
3.6.2 Single-Strand-Conformation-Polymorphism (SSCP)-Analyse	81
3.6.3 Sequenzierung	82
3.7 Exon 26 der Myomesin Gen-Analyse.....	83
3.7.1 Polymerase-Chain-Reaction (PCR)	83
3.7.2 Single-Strand-Conformation-Polymorphism (SSCP)-Analyse	83
3.7.3 Sequenzierung	84
4. Diskussion.....	85
4.1 HCM-Kollektiv und Methoden	85
4.2 Warum Myomesin als mögliche Ursache der HCM ?	87
4.3 Beurteilung der Ergebnisse	88
4.3.1 Identifikation der Mutation Leu390Phe im <i>MYOM</i> -Gen	88
4.3.1.1 Mutation Leu390Phe in Familie S	88
4.3.1.2 Stellenwert der Mutation Leu390Phe	91
4.3.2 SNPs im Intron- und "Splice-Site"-Bereich	92
4.3.3 SNPs und weitere Missense-Mutation im Exonbereich	95
4.4 Schlussfolgerung.....	96
5. Zusammenfassung.....	97
6. Abkürzungsverzeichnis	99
7. Literaturverzeichnis.....	101
8. Danksagung.....	108
9. Erklärung.....	109
10. Curriculum Vitae.....	110

1. Einleitung

1.1 Kardiomyopathien: Definition und Klassifikation

Definition

“Kardiomyopathien sind eine heterogene Gruppe von Krankheiten des Herzmuskels, die mit mechanischen und/oder elektrischen Funktionsstörungen einhergehen und üblicherweise (aber nicht zwingend) eine unangemessene Hypertrophie oder Dilatation der Herzkammern verursachen. Ihre Ursachen sind vielfältig und häufig genetisch bedingt. Kardiomyopathien begrenzen sich entweder auf das Herz oder sind Teil einer allgemeinen Systemerkrankung, führen oft zu kardiovaskulär bedingten Todesfällen oder einer fortschreitenden Behinderung durch Herzversagen“ (Maron *et al.*, 2006).

Klassifikation

Mitte der 50er Jahre des neunzehnten Jahrhunderts war die chronische Myokarditis die einzige Krankheit, die als Ursache einer strukturellen Herzmuskelerkrankung bekannt war. Um 1900 etablierte sich der Begriff der “Primären Herzmuskelerkrankung“, und es dauerte schließlich bis 1957, bis der Begriff “Kardiomyopathie“ erstmals auftauchte. In den darauf folgenden 25 Jahren wurden mehrfach neue Definitionen verbunden mit der weiteren Erforschung und dem besseren Verstehen der Pathogenese der Krankheit etabliert.

Kardiomyopathien werden in zwei Hauptgruppen unterteilt. Primäre Kardiomyopathien (genetische, nicht genetische, erworbene) betreffen in der Regel nur oder hauptsächlich den Herzmuskel. Sekundäre Kardiomyopathien weisen die pathologische Herzmuskelbeteiligung als Teil einer Reihe verschiedenster generalisierter systemischer Funktionsstörungen auf. Diese mit den sekundären Formen der Kardiomyopathie verbundenen Systemerkrankungen wurden in früheren Klassifikationen den “spezifischen Kardiomyopathien“ oder “spezifischen Herzmuskelerkrankungen“ zugeordnet; diese Nomenklatur wurde jedoch verlassen. Die Häufigkeit und der Schweregrad der Herzbeteiligung variieren bei diesen Systemerkrankungen erheblich. Bei einigen Erkrankungen ist die Herzbeteiligung häufig, bei anderen ist der pathologische Herzbefund selten und nur in einigen Fällen nachgewiesen. Da viele Kardiomyopathien vorwiegend das Herz betreffen, sich aber nicht nur auf dieses Organ beschränken, ist die Unterscheidung zwischen primärer und sekundärer Kardiomyopathie in einigen Fällen relativ willkürlich und beruht auf der Beurteilung über die klinische Wichtigkeit und die Konsequenz des vorliegenden Herzmuskelprozesses. Aus diesem Grund wird die Einteilung in primäre Kardiomyopathien genetischer, gemischter (genetischer und nicht genetischer) und erworbener Genese sowie sekundäre Kardiomyopathien empfohlen (Maron *et al.*, 2006).

1.1.1 Primäre Kardiomyopathien

A) Genetische Kardiomyopathien

Hypertrophe Kardiomyopathie (HCM). Charakteristisch ist die links- oder biventrikuläre Hypertrophie, die typischerweise asymmetrisch ist. Hierbei unterscheidet man zwischen einer “obstruktiven“ und einer “nicht obstruktiven“ Form. In der Histologie zeigt sich typischerweise eine Fehlanordnung (“disarray“) der hypertrophierten Kardiomyozyten. Meist liegt dieser Erkrankung ein autosomal dominanter Vererbungsweg von Genen kontraktile Proteine zugrunde. Arrhythmien und plötzlicher Herztod sind relativ häufig.

Arrhythmogene rechtsventrikuläre Kardiomyopathie (ARVC). Pathognomonisch ist der progrediente, zunächst fokale, später ausgedehnte fibrolipomatöse Umbau vor allem des rechten Ventrikels. Ein autosomal dominanter Vererbungsweg mit inkompletter Penetration sowie eine rezessive Vererbung können vorliegen. Arrhythmien und plötzlicher Herztod sind häufig.

Linksventrikuläre (LV) Noncompaction. Die “Noncompaction“ des Kammermyokards ist eine kürzlich entdeckte kongenitale Kardiomyopathie, die durch ein charakteristisches spongiöses morphologisches Erscheinungsbild des Kammermyokards geprägt ist.

Reizleitungserkrankungen

Lenègre-Erkrankung. Diese auch als progressiver Herzleitungsdefekt bekannte Erkrankung ist durch die fortschreitende Entwicklung von Defekten im His-Purkinje-System gekennzeichnet.

Ionenkanalerkrankungen. Es existiert eine wachsende Anzahl verschiedener ererbter und kongenitaler arrhythmischer Störungen, die von Mutationen von Genen verursacht werden, die für Ionenkanalproteinen kodieren, die für den Natrium- und Kalium-Transport durch die Zellmembran zuständig sind:

-Das (lange) QT-Syndrom.

-Brugada-Syndrom.

-Katecholaminerge polymorphe ventrikuläre Tachykardie.

-Das kurze QT-Syndrom (SQTS).

B) Gemischte Kardiomyopathien (genetische und nicht genetische)

Dilatative Kardiomyopathie (DCM). Kardiale Dysfunktion bei links- oder biventrikulärer Dilatation. Der alleinige histologische Befund der Endomyokardbiopsien (EMB) ist häufig unspezifisch. Erst unter Verwendung einer subtilen Diagnostik der EMB lassen sich virale und/oder immunologisch bedingte Formen von der idiopathischen Form der DCM abgrenzen. Des Weiteren werden auch familiäre, durch Stoffwechselerkrankungen bedingte und toxische DCM-Formen unterschieden.

Restriktive Kardiomyopathie (RCM). Charakteristisch sind die restriktive Füllung und der erhöhte diastolische Druck eines oder beider Ventrikel bei nahezu normaler linksventrikulärer systolischer Funktion. Die RCM kann "idiopathisch" sein oder im Zusammenhang mit anderen Erkrankungen (z.B. Amyloidose, Speichererkrankungen, Hypereosinophilie) auftreten.

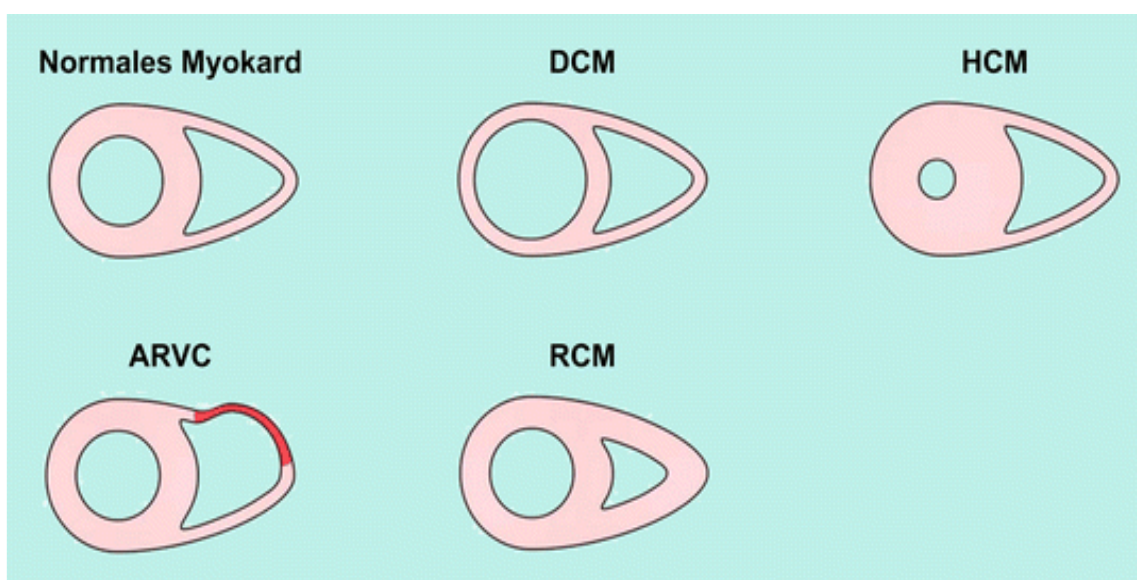


Abbildung 1.1: Morphologische Charakteristika der Kardiomyopathien. DCM: Dilatative Kardiomyopathie; HCM: Hypertrophe Kardiomyopathie; RCM: Restriktive Kardiomyopathie; ARVC: Arrhythmogene rechtsventrikuläre Kardiomyopathie. Modifizierte Abbildung aus Davies MJ.(2000).

C) Erworbene Kardiomyopathien

Myokarditis. Bei der Myokarditis handelt es sich um einen akuten oder chronischen, den Herzmuskel betreffenden Entzündungsprozess, der durch ein breites Spektrum von Toxinen und Drogen, Infektionserregern meist viraler, aber auch bakterieller Natur, Pilzen oder Parasiten ausgelöst wird. Als weitere potenzielle Auslöser gelten die Intestinale Lipodystrophie (Morbus Whipple), die Riesenzellmyokarditis sowie

Überempfindlichkeitsreaktionen gegen Pharmaka wie bestimmte Antibiotika, Sulfonamide, Antikonvulsiva oder Entzündungshemmer.

Stress-Kardiomyopathie (“**Tako-Tsubo-Kardiomyopathie**“). Die erstmals in Japan unter dem Namen Tako-Tsubo beschriebene Stress-Kardiomyopathie ist durch eine akute, jedoch rasch reversible systolische Kammerdysfunktion charakterisiert, die durch starken psychischen Stress ausgelöst wird. Definitionsgemäß tritt die Krankheit in Abwesenheit einer manifesten KHK auf.

Andere

Die **peripartale (postpartale) Kardiomyopathie** ist eine selten dilatative Herzmuskelerkrankung, die mit einer linksventrikulären systolischen Dysfunktion und Herzversagen unbekannter Ursache einhergeht und im dritten Trimester der Schwangerschaft oder innerhalb der ersten 5 Monate nach der Geburt des Kindes auftritt. Meist tritt die peripartale Kardiomyopathie bei übergewichtigen Multipara über 30 Jahre mit Präeklampsie auf.

1.1.2 Sekundäre Kardiomyopathien

Die sekundären Kardiomyopathien sind in der nächsten Tabelle aufgeführt:

Sekundäre Kardiomyopathien
Infiltrative
Amyloidose (primäre, familiäre autosomal dominante, senile, sekundäre Formen)
Morbus Gaucher
Morbus Hurler
Morbus Hunter
Speicherkrankheiten
Hämochromatose
Morbus Fabry
Glykogen-Speicherkrankheit (Typ II, Pompe)
Morbus Niemann-Pick
Toxische
Drogen, Schwermetalle, chemische Stoffe
Endomyokardiale
Endomyokardiale Fibrose
Hypereosinophiles Syndrom (Löffler-Endokarditis)
Entzündliche (granulomatöse)
Sarkoidose

Endokrine
Diabetes mellitus
Hyperthyreoidismus
Hypothyreoidismus
Hyperparathyreoidismus
Phäochromozytom
Akromegalie
Kardiofaziale
Noonan-Syndrom
Lentiginose
Neuromuskuläre/neurologische
Friedreich-Ataxie
Muskeldystrophie Typ Duchenne-Becker
Muskeldystrophie Typ Emery-Dreifuss
Myotone Dystrophie
Neurofibromatose
Tuberöse Sklerose
Mangelernährung
Beriberi, Pellagra, Skorbut, Selen, Carnitin, Kwashiorkor
Autoimmune/Kollagenosen
Systemischer Lupus erythematodes
Dermatomyositis
Rheumatoide Arthritis
Sklerodermie
Panarteriitis nodosa
Elektrolytentgleisung
Als Folge einer Tumorbehandlung
Anthracycline
Cyclophosphamide
Bestrahlung

Tabelle 1.1: Sekundäre Kardiomyopathien.

1.2 Hypertrophe Kardiomyopathie

Die Hypertrophe Kardiomyopathie (HCM) ist eine primäre Herzmuskelerkrankung mit einer Prävalenz von 1:500 (Maron *et al.*, 1994 und Maron *et al.*, 1995). Sie zählt zu den häufigsten erblichen Herzerkrankungen. Bei über der Hälfte der Patienten wird eine familiäre Häufung mit meist autosomal dominantem Erbgang mit variabler Expression beobachtet. Der Phänotyp kann von asymptomatisch bis zum plötzlichen Herztod (PHT) variieren. Die HCM trifft meistens junge Männer zwischen 10 und 25 Jahren und ist die häufigste Ursache von plötzlichem Herztod (PHT) vorher gesunder Männer und Athleten (Elliot and McKenna, 2004). Der PHT kann bei jungen HCM-Patienten die Erstmanifestation darstellen (Maron *et al.*, 1996).

Ursachen des plötzlichen Herztodes beim jungen Leistungssportler

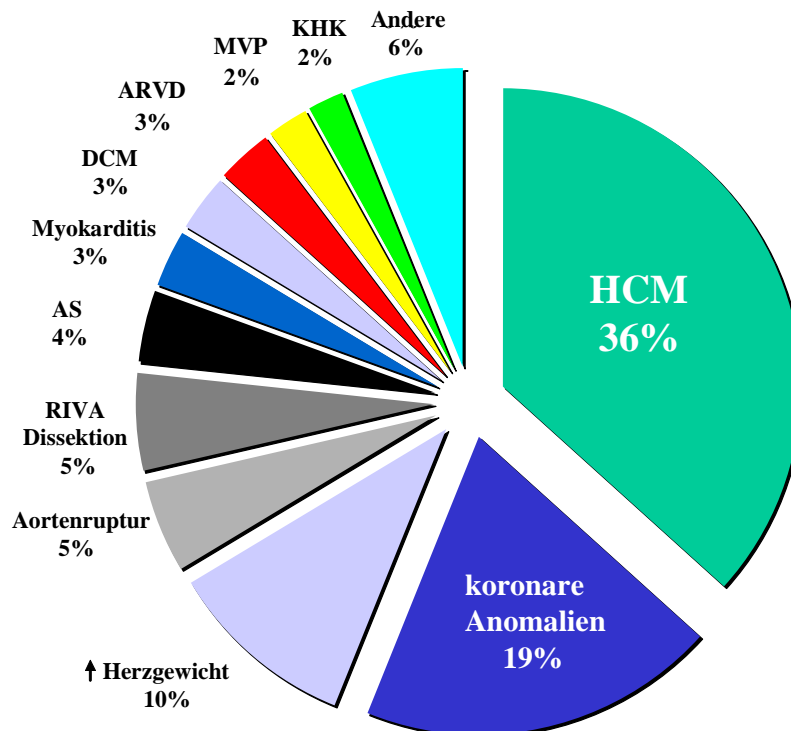


Abbildung 1.2: Ursachen des plötzlichen Herztodes beim jungen Leistungssportler (Durchschnittsalter: 17 Jahre) basierend auf der systematischen Analyse von 158 verstorbenen Leistungssportlern in den USA. ↑ Herzgewicht; Herzen mit vergrößertem Gewicht und ähnlichen morphologischen Charakteristika wie HCM, die in der Diagnostik nicht den Kriterien der HCM entsprechen; RIVA: Ramus interventricularis anterior; AS: Aortenstenose; DCM: Dilatative Kardiomyopathie; ARVD: arrhythmogene rechtsventrikuläre Dysplasie; MVP: Mitralklappenprolaps; KHK: koronare Herzkrankheit. Modifiziert aus Maron B.J. (1997).

1.2.1 Anatomische und histologische Charakteristika der HCM

Die HCM wird durch eine unerklärte linksventrikuläre Hypertrophie ohne sekundäre Ursachen wie Hypertonie, Arteriosklerose oder valvuläre Stenosen diagnostiziert. Sie ist charakterisiert durch eine vergrößerte Wanddicke des linken und/oder rechten Ventrikels ≥ 13 mm (McKenna *et al.*, 1997). Die Hypertrophie ist meist asymmetrisch und bezieht das interventrikuläre Septum mit ein. Typischerweise ist das Volumen des linken Ventrikels normal oder reduziert. Neben der Hypertrophie ist die ungeordnete Aneinanderlagerung und die Vergrößerung der Myozyten ("Myocyte disarray") eine andere typische morphologische Veränderung. Die Herzmuskelzellen im gesunden Gewebe sind gleichmäßig angeordnet und weisen eine minimale Fibrosierung auf. Im hypertrophierten Herzen sind die Zellen vergrößert und weisen eine ungeordnete Gewebsarchitektur mit einer Zunahme von interstitieller Fibrosierung auf (Seidman *et al.*, 2001). Es kann ebenfalls zu einer Verdickung der Media intramuraler Koronargefäße kommen.

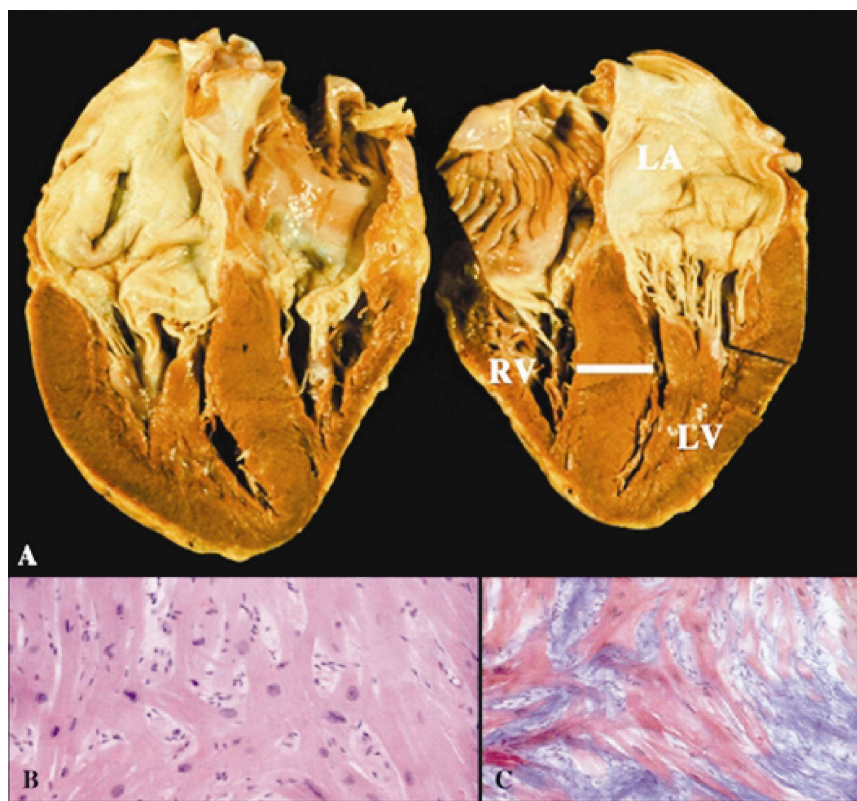


Abbildung 1.3: Anatomische Charakteristika bei HCM. A) Evidente linksventrikuläre (LV) Hypertrophie unter Einbeziehung des interventrikulären Septums. Rechtsventrikuläre (RV) Hypertrophie und linksatriale (LA) Erweiterung sind ebenfalls erkennbar. B) Histopathologische Herzmuskelsektion gefärbt mit Hämatoxylin-Eosin. Die Sektion zeigt die Vergrößerung sowie die zelluläre ungeordnete Aneinanderlagerung der Myozyten. C) Masson-Trichrome-Färbung. Die Muskelsektion zeigt eine fortgeschrittene interstitielle Fibrosierung (blau) zwischen hypertrophierten Myozyten (rosa). Abbildung aus Arad *et al.* (2002).

1.2.2 Klinische Merkmale

Die als Folge der Hypertrophie verminderte diastolische Relaxation des Myokards führt zu erhöhten enddiastolischen Füllungsdrücken und damit zu erhöhten linksatrialen und pulmonalvenösen Drücken. Diese verursachen die typischen Symptome der Herzinsuffizienz. Die häufigsten Symptome sind Dyspnoe (90% der Patienten) und typische oder atypische Angina pectoris (75% der Patienten). Arrhythmien, insbesondere Vorhofflimmern und ventrikuläre Tachykardie, sind relativ häufig (Marian und Roberts, 2001). Besonders bei der HOCM (Hypertrophe obstruktive Kardiomyopathie) kann es infolge tachykarder Rhythmusstörungen und/oder eines inadäquaten Herzzeitvolumens unter Belastung zu Palpitationen, Synkopen und zum plötzlichen Herztod kommen. Der plötzliche Herztod kann das erste Krankheitssymptom darstellen. 10-30% der symptomatischen Patienten leiden unter Schwindel und Synkopen.

Ca. 25 % der HCM-Patienten weisen linksventrikuläre Ausflussstörungen und einen intraventrikulären Druckgradienten mit Mitralklappeninsuffizienz auf (Marian und Roberts, 2001).

Obwohl die HCM die häufigste Ursache für den plötzlichen Herztod der jungen Bevölkerung ist, stellt sie für die ältere Bevölkerung eine relativ gutartige Krankheit dar. Man schätzt, dass die jährliche Sterblichkeitsziffer ca. 1-2% beträgt (Elliott und McKenna, 2004).

1.2.3 Genetische Merkmale

Ursachen der HCM

Meist liegt dieser Erkrankung ein autosomal dominanter Vererbungsweg von Genen kontraktiver Proteine zugrunde. Die HCM wird meist durch Mutationen in Sarkomer-Proteinen verursacht und deswegen als "Sarcomere disease" bezeichnet. Bis heute wurden mehr als 400 Mutationen in 13 Genen als Ursache für die HCM identifiziert (Elliot und McKenna, 2004; Maron *et al.*, 2006). Die meisten der identifizierten Mutationen, die als Ursache für die HCM in Betracht kommen, sind Missense-Mutationen. Der Austausch eines einzigen Nukleotids verursacht dabei einen Aminosäureaustausch. Dies kann der Funktionsfähigkeit des Proteins schaden und daher die Entstehung der Krankheit verursachen. Veröffentlichte genetische Daten zeigen, dass die bislang bekannten Mutationen in Sarkomer-Proteinen für nur 60% der Krankheitsfälle verantwortlich sind (Marian und Roberts, 2001; Seidman *et al.*, 2001; Franz *et al.*, 2001 and Richard *et al.*, 2003). Diese Daten suggerieren die Existenz anderer bisher unbekannter Gene, die verantwortlich sein könnten.

Ursache der HCM können auch Stoffwechseldefekte sein: Defekte im *mitochondrialen Metabolismus* (Marin-García *et al.*, 1997), *Morbus Fabry* (Sachdev *et al.*, 2002) und *Mutationen im PRKAG2-Gen*. Dieser letzte Gen-Defekt führt zur Aktivitätsverminderung der AMP-Kinase, die eine wichtige Rolle im Glykogen-Metabolismus spielt. Als Folge davon

wird Glykogen angehäuft und eingelagert (Glykogen-Speicherkrankheit). Dies äußert sich unter anderem durch kardiale Hypertrophie verbunden mit ventrikulärer Präexzitation und progressiver Reizleitungsstörung (Blair *et al.*, 2001; Arad *et al.*, 2002).

Mutationen in Genen, die die folgenden Proteinen kodieren, sind gut erforschte und anerkannte Ursachen der HCM: *β -myosin heavy chain (β MHC)*, *myosin binding protein C (MyBPC)*, *cardiac Troponin T (TnT)*, *cardiac Troponin I (TnI)*, *α -tropomyosin (α TM)*, *essential und regulatory light chains (ELC und RLC)* sowie *cardiac actin (ACTC)* (Seidman und Seidman 2001; Roberts *et al.*, 2001; Marian *et al.*, 2001).

HCM-Ursachen können auch Mutationen in Genen sein, die wichtige Proteine für die Funktion und den Zusammenbau des Sarkomers kodieren: *Titin* (Satoh *et al.*, 1999), *α -MAHC* (Seidman 2001), *myosin light chain kinase* (Davis *et al.*, 2001) und *muscle LIM protein* (Geier *et al.*, 2001; Geier *et al.*, 2003).

Genetische Ursachen der HCM				
Protein	Gen	Locus	Prävalenz	Erstbeschreibung
<i>β-myosin heavy chain</i>	MYH 7	14q1	~25%	<i>Geisterfer-Lowrance et al. 1990.</i>
<i>cardiac myosin-binding protein C</i>	MYBPC3	11q11	~25%	<i>Bonne et al. 1995.</i>
<i>cardiac troponin T</i>	TNNT2	1q3	<5%	<i>Thierfelder et al. 1994.</i>
<i>cardiales troponin I</i>	TNNI3	19q13	<5%	<i>Kimura et al. 1997.</i>
<i>regulatory myosin light chain</i>	MYL2	12q23- 24.3	<5%	<i>Poetter et al. 1996.</i>
<i>essential myosin light chain</i>	MYL3	3p21.2-p21.3	~1%	<i>Poetter et al. 1996.</i>
<i>α-tropomyosin</i>	TPM1	15q2	~1%	<i>Thierfelder et al. 1994.</i>
<i>muscle LIM protein</i>	CSRP3	11p15.1	~1%	<i>Geier et al. 2003.</i>
<i>cardiac actin</i>	ACTC	15q14	<1%	<i>Mogensen et al. 1999.</i>
<i>Titin</i>	TTN	2q31	?	<i>Satoh et al. 1999.</i>
<i>α-myosin heavy chain</i>	MYH6	14q11-q12	?	<i>Nimura et al. 2002.</i>
<i>cardiac troponin C</i>	TNN1	3p21-p14	?	<i>Hoffman et al. 2001.</i>
<i>telethonin</i>	Tcap	17q11-q12	?	<i>Hayashi et al. 2004.</i>

Tabelle 1.2: Genetische Ursachen der HCM. Aus Pellnitz *et al.*, (2005).

1.2.4 Genotyp-Phänotyp-Korrelation

Genetische Studien zeigen eine Korrelation zwischen dem Phänotyp und dem Genotyp bei der HCM. Es wurde nachgewiesen, dass der klinische Phänotyp und dementsprechend die Krankheitsprognose mit bestimmten Mutationen assoziiert ist. Es konnte bewiesen werden, dass Mutationen der β -myosin heavy chain zu früherem Auftreten der Krankheit, starker Hypertrophie und einer höheren Inzidenz des PHT führen. Selbst Mutationen im selben Gen, die in verschiedenen Loci lokalisiert sind, zeigen unterschiedliche Krankheitsverläufe. So bedeuten beispielsweise Arg403Gln-, Arg719Gln- und Arg453Cys-Mutationen in der β -myosin heavy chain ein höheres Risiko, dem PHT zu erliegen. Dagegen haben Val606Met-Mutationen eine eher benigne Verlaufsform.

Mutationen im cardiac myosin binding protein C oder α -tropomyosin weisen eine bessere Prognose mit geringerer Hypertrophie und niedrigerem PHT-Risiko auf. Im Gegensatz dazu wurden Mutationen im Gen für Troponin T in einzelnen Familien als äußerst homogen in Hinsicht auf ein höheres Risiko, an PHT zu versterben, beschrieben und galten so als besonders maligne trotz des Fehlens einer Hypertrophie (Watkins *et al.*, 1995). Neuere Arbeiten zweifeln diese Assoziation jedoch an (Torricelli *et al.*, 2003; Van Driest *et al.*, 2003).

Mutationen und Prognose der HCM			
Gene	Prognose		
	Gute	Mittlere	Schlechte
βMHC	Gly256Glu Leu908Val Val606Met Phe513Cys Asn232Ser	Arg249Gln Glu930Lys Val606Met	Arg403Gln Arg719Trp Arg453Cys Arg723Gly
Troponin T	Ser179Phe	Phe110Ile	Arg92Gln Arg92Trp Ile79Asn Δ Glu160 Ser179Phe (homozygote)
MYBPC		SASint20	
α-tropomyosin	Asp175Asn		

Tabelle 1.3: Mutationen und Prognose der HCM. Aus Roberts und Sigwart (2001).

Die Arg403Gln-Mutation der β -myosin heavy chain ist die am häufigsten beschriebene Mutation. Die untersuchten Familien zeigen, dass ca. 50% der Patienten, die die Arg403Gln-Mutation aufweisen, den vorzeitigen Tod (vor allem durch PHT) erleiden. Die durchschnittliche Lebenserwartung in dieser Gruppe beträgt lediglich 28 Jahre. Diese Mutation ist mit schwerer Hypertrophie, hoher Penetranz, früherem Auftreten der Krankheit und hoher Inzidenz des PHT assoziiert. Auch die anderen zur Gruppe mit schlechter Prognose

gehörenden Mutationen wie Arg453Cys und Arg719Trp sind mit hoher Penetranz, schwerer Hypertrophie und hoher Inzidenz des PHT assoziiert.

Die durchschnittliche Lebenserwartung von Patienten mit der Mutation Glu930Lys und Arg249Gln in der β -myosin heavy chain (mittlere Prognose) beträgt ca. 40 Jahre.

Im Gegensatz dazu sind drei Mutationen (Gly256Glu, Val606Met und Leu908Val) der β -myosin heavy chain mit einer benignen Prognose und einer fast normalen Lebenserwartung verbunden. Diese Mutationen zeigen eine niedrige Penetranz, geringe Hypertrophie und ein späteres Auftreten der Krankheit. Die kumulative Rate des PHT bei Patienten mit familiärer HCM aufgrund der genannten Mutationen liegt im Alter von 50 Jahren bei unter 5% (Marian *et al.*, 1998).

Die meisten Mutationen im α -tropomyosin- und MyBPC-Gen sind mit niedriger Penetranz, geringer Hypertrophie und niedriger Inzidenz des PHT assoziiert. Die Mutation Val95Ala im α -tropomyosin-Gen ist mit einer hohen Inzidenz des PHT trotz nur minimaler Hypertrophie verbunden (Karibe *et al.*, 2001).

Die Variabilität des Phänotyps kann teilweise durch die Rolle, die die mutierten Proteine im Sarkomer spielen, und die Effekte, die sie auf die Struktur und Funktion des Sarkomers haben, erklärt werden. Andere Faktoren können die Effekte von mutierten Proteinen modifizieren. Dies würde zu Änderungen der morphologischen und pathophysiologischen Charakteristika der HCM führen. Die erste Studie über die Phänotypisierung von Individuen verschiedener Bevölkerungen hat bewiesen, dass Individuen mit gleicher Mutation, sogar innerhalb einer Familie, wichtige Unterschiede im Phänotyp zeigen können (Fananapazir *et al.*, 1994). Dies bedeutet, dass nicht nur eine Mutation den Phänotyp bestimmen kann und dass es Faktoren gibt, die die Effekte von mutierten Proteinen modifizieren können. Diese spezifischen Faktoren sind unter anderem genetische, Umwelt-, geschlechtspezifische und erworbene Faktoren. Ein Beispiel eines genetischen Faktors ist die Assoziation von Mutationen oder Polymorphismen. Es wurde festgestellt, dass Polymorphismen des ACE-Gens mit einem erhöhten Risiko von PHT assoziiert sind (Marian *et al.*, 1993). Mutationen oder Polymorphismen anderer Gene (Renin-Angiotensin-System, Aldosteron, Endothelin und Tumornekrosefaktor (TNF)) können den Verlauf der Hypertrophie negativ beeinflussen (Ortlepp *et al.*, 2002).

1.3 Das Sarkomer

Überblick

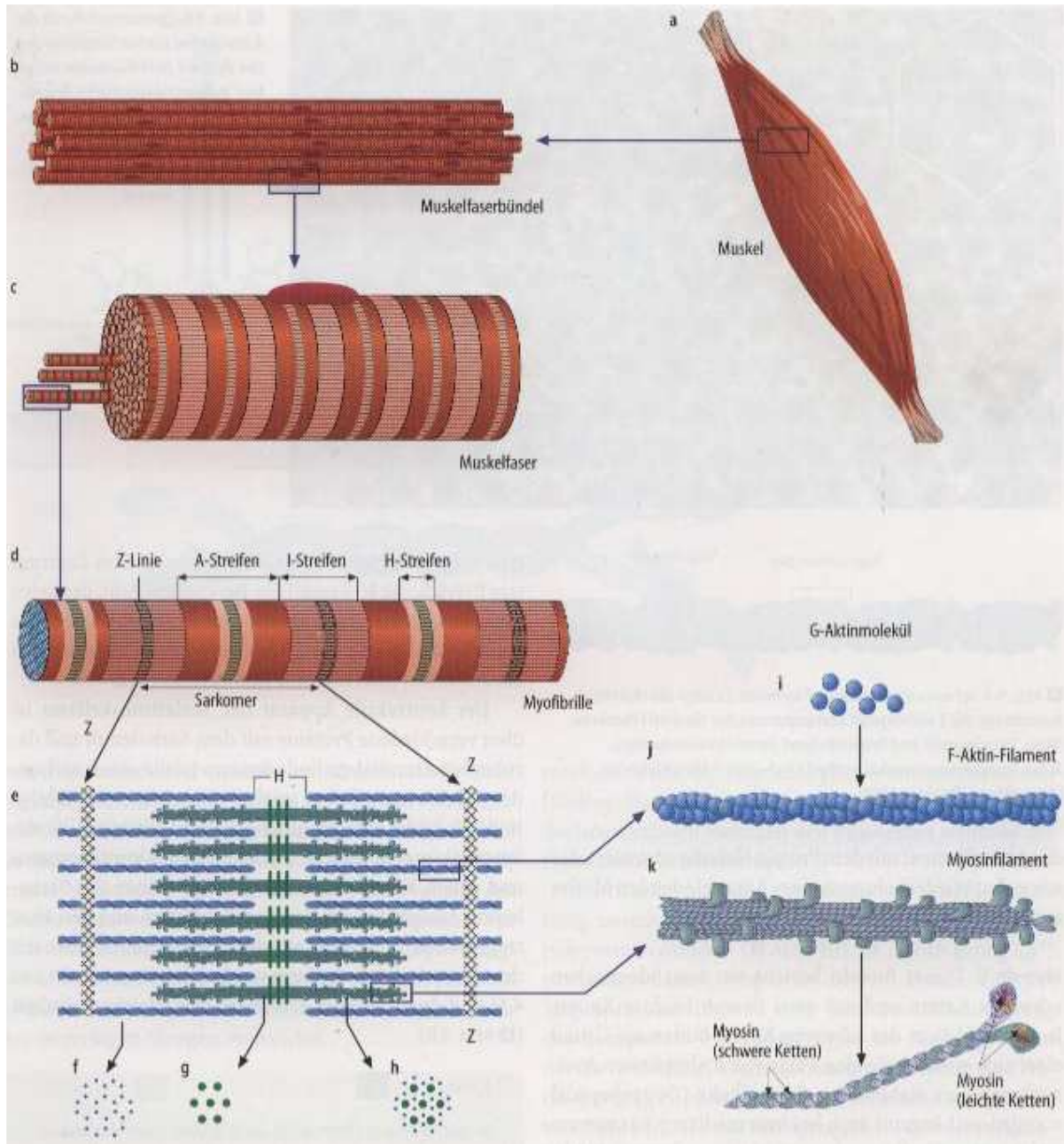


Abbildung 1.4: Histologischer, ultrastruktureller und molekularer Aufbau von Muskelfasern, Myofibrillen sowie Aktin- und Myosinfilamenten (Aus Löffler und Petrides 1998).

Das Sarkomer ist die Einheit des kontraktiven Apparates des Muskelgewebes. Viele hintereinander geschaltete Sarkomere ergeben eine Myofibrille, die einen Durchmesser von 1-2 μm hat und etwa 4000 dünne Aktin- und 100 dicke Myosin-Filamente enthält. Die dünnen Filamente setzen sich neben Aktin aus Troponin, Tropomyosin und Nebulin (Nebulette im Herz) zusammen, während die dicken hauptsächlich aus Myosin aufgebaut sind. Aktin und Myosin machen zusammen etwa 55 % der Proteine im Skelettmuskel aus. Unter dem

Mikroskop zeigen längs geschnittene Muskelfasern eine Streifung, die aus hellen und dunklen Banden besteht (siehe Abbildung 1.5). Die dunklen Banden werden A-Banden (von anisotrop = im polarisierten Licht doppelt brechend), die hellen I-Banden (von isotrop) genannt. Im Elektronenmikroskop wird die dunkle Z-Linie sichtbar, die die I-Bande in der Mitte teilt. Zwischen zwei Z-Linien spannt sich die kleinste sich wiederholende Einheit des kontraktiven Apparates aus, das Sarkomer, dessen Länge in Ruhezustand etwa 2,2-2,4 μm beträgt. Die dicken Filamente sind 1,6 μm lang und nehmen die A-Bande im Zentrum des Sarkomers ein. Die Enden der Myosinfilamente sind am Z-Streifen mit Hilfe von Titin verankert. Die etwa 1 mm langen dünnen Filamente verlaufen zwischen und parallel zu den dicken Filamenten. Die Aktinfilamente sind durch α -Aktinin mit der Z-Linie verbunden. Sie bilden die I-Bande und reichen bis in die A-Bande, wo sie mit dicken Filamenten überlappen. Im Zentrum der A-Bande fällt ein hellerer Bezirk auf, der nur aus dicken Filamenten besteht und als H-Bande bezeichnet wird. Die H-Bande wird in der Mitte durch die M-Bande geteilt.

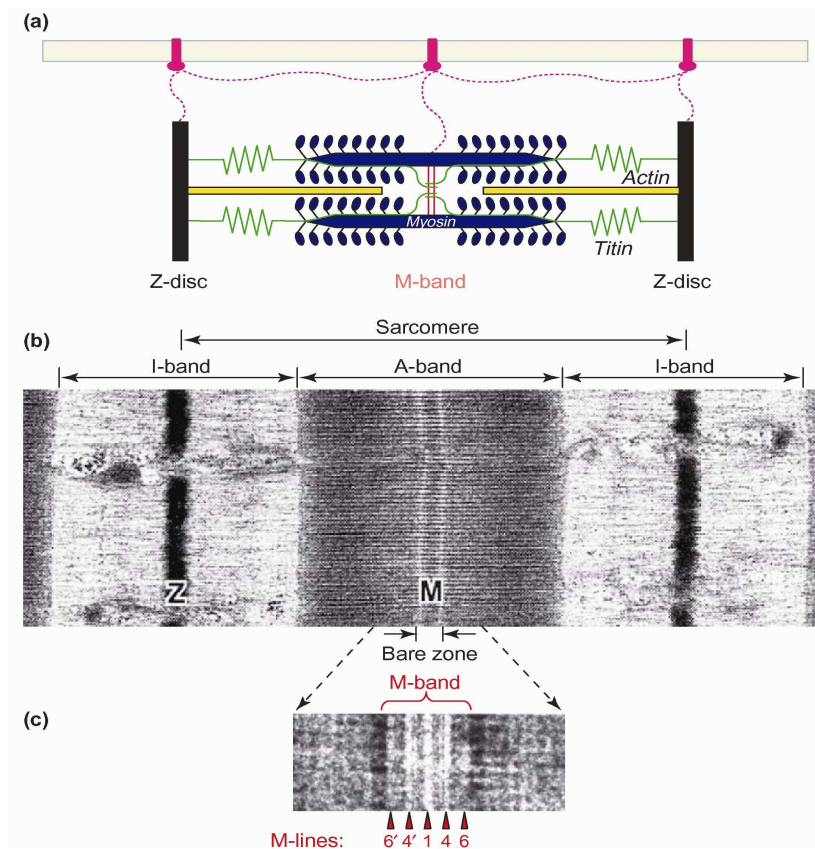


Abbildung 1.5: Darstellung der Sarkomer-Strukturen. a) Gelb: Aktin-Filamente; blau: Myosin-Filamente; grün: Titin-Filamente. Die transversalen Strukturen sind die Z-Scheiben (schwarz) und die M-Bande (rot). Die extrasarkomerischen Proteine (rosa) sind im Sarkolemm durch transmembranale Proteine verankert. b) Elektronenmikroskopische Aufnahmen der oben genannten Sarkomer-Strukturen. Jedes Sarkomer ist durch zwei Z-Linien begrenzt, die sich in der Mitte der I-Bande befinden. Die M-Bande befindet sich in der Mitte der A-Banden in der "bare zone", einem Bereich mit unterschiedlicher Elektrodensität, in dem Myosin- und Aktin-Filamente nicht vorkommen. c) Elektronenmikroskopische Aufnahmen einer longitudinalen Myofibrillen-Sektion des M-Banden-Bereichs. Die M-Linien (oder M-Brücken) sind mit Nummern versehen: M1, M4/M4' und M6/M6'. Abbildung aus Agarkova et Perriard (2005) und Sjostrom *et al.*, (1977).

1.3.1 Kontraktionsmechanismus: Aktin-Myosin-Interaktion

Im ruhenden Muskel wird die feste Bindung zwischen Myosinköpfchen und Aktin durch Tropomyosin-Proteine verhindert. Ist jedoch genug Calcium vorhanden, dann bindet es an die TnC-Untereinheit des Troponins und führt zu einer Konformationsänderung des Komplexes. Tropomyosin gibt die Bindungsstellen für die hochaffine Wechselwirkung von Myosin und Aktin frei und es bildet sich eine Querbrücke aus. Steht kein ATP zu Verfügung, bleibt der starke Aktin-Myosin-Komplex nach Dissoziation des ADP-Moleküls bestehen, wie es bei der Totenstarre der Fall ist. Bei Anwesenheit von ATP wird der feste Aktin-Myosin-Komplex durch Bindung eines ATP-Moleküls gelöst. Dieses wird dann vom Myosinköpfchen gespalten, das sich dabei aufrichtet und mit dem benachbarten Aktinmonomer Kontakt aufnimmt. Anschließend knickt das Myosinköpfchen beim erneuten Übergang in einen festen Aktin-Myosin-Komplex unter Abgabe von anorganischem Phosphat wieder ab. Etwa 300 Myosinköpfchen, die aus einem dicken Filament herausragen, können dabei mit den umgebenden Aktinfilamenten interagieren und ziehen es so in die A-Bande hinein. Dieser sogenannte Querbrückenzyklus kann sich in Anwesenheit von ATP 2-10 mal pro Sekunde wiederholen. Die Kontraktion dauert solange an, bis Calcium entfernt und die Bindungsstellen für Myosin am Aktin wieder von Tropomyosin bedeckt werden.

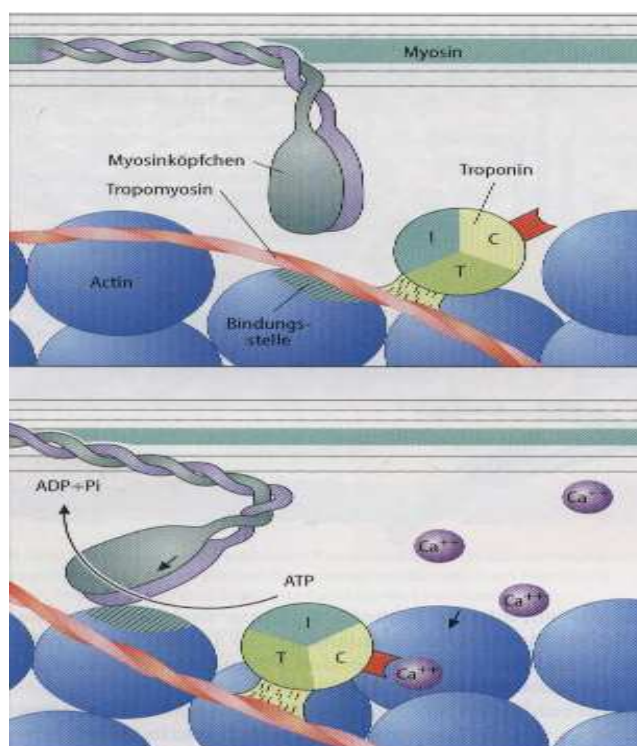


Abbildung 1.6: Molekularer Mechanismus der Kontraktion. Die Ausbildung von Querbrücken zwischen Aktin und Myosinköpfchen und deren Konformationsänderungen erlauben eine Verschiebung von dicken und dünnen Filamenten während der Muskelkontraktion. Die notwendige Energie wird dabei durch die Spaltung von ATP durch die Myosinköpfe geliefert. Calcium bindet an Troponin C. Dadurch ändert sich die Position des Tropomyosinkomplexes und die hochaffine Bindungsstelle am Aktin für Myosin wird frei (Aus Junqueira *et al.* 1998).

1.3.2 Nicht alles ist Aktin und Myosin: Das Sarkomer-Zytoskelett

Während die Aktin-Myosin-Interaktion zur Kontraktionskraft führt, sind andere Sarkomer-Proteine für die Effizienz und die Optimierung dieser Interaktion sehr wichtig. Das sogenannte Sarkomer-Zytoskelett besteht aus drei grundlegenden Elementen. Die transversalen Strukturen werden durch die sogenannten Z-Scheiben, in denen die dünnen Aktin-Filamente mit Hilfe von Alpha-Aktinin verankert sind, sowie durch die M-Bande gebildet, das die dicken Myosin-Filamente im Zentrum des Sarkomers quervernetzt. Diese beiden Transversalstrukturen werden longitudinal durch das elastische Titin verbunden.

Z-Scheiben und Titin waren bereits Gegenstand intensiver Forschung während über die Molekularstruktur der M-Bande noch relativ wenig bekannt ist. In der letzten Zeit wurden neue Erkenntnisse über die M-Bande gewonnen, die unser Verständnis über die Funktion und Wirkungsweise dieser Struktur erhöhen.

1.3.2.1 Die M-Bande

Die M-Bande entspricht der Transversalstruktur in der Mitte des Sarkomers und ist für die korrekte Ausrichtung der dicken Filamente verantwortlich (Luther *et al.*, 1981). Die M-Banden-Filamente sorgen für die genaue Anordnung der dicken Myosinfilamente während der Kontraktion des Sarkomers und verhindern die Deformation dieser angeordneten Filamenten-Gitter während der Entspannung des Sarkomers. Dies ermöglicht den optimalen und konstanten Abstand zwischen dicken und dünnen Filamenten zu Beginn der Kontraktion (Millman *et al.*, 1998; Agarkova *et al.*, 2003). Die M-Bande spielt eine wichtige organisatorische Rolle im Verlauf der Myofibrillogenese, wenn die sich im Aufbau befindlichen dicken Filamente sich zusammen mit den Titin-Filamenten in ein hexagonales Gitter integrieren (Wang *et al.*, 1998; Ehler *et al.*, 1999; Yang *et al.*, 2000).

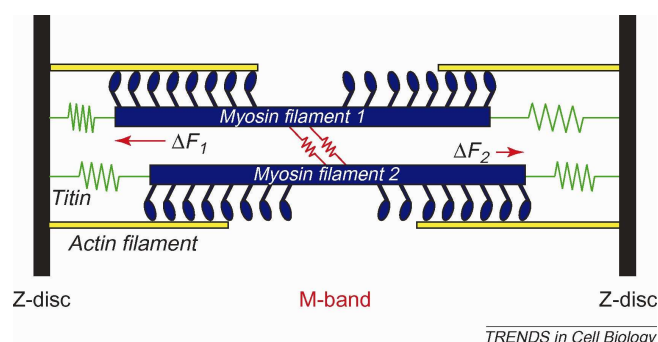


Abbildung 1.7: Die elastischen Titin-Filamente und die M-Bande haben unterschiedliche Aufgaben im aktivierten Sarkomer. Während der Aktivierung des Sarkomers tendieren die dicken Filamente entsprechend der Anzahl aktivierter Brückenverbindungen auf beiden Seiten dazu, in verschiedene Richtungen auszubrechen. Die M-Banden-Filamente verhindern ein Ungleichgewicht in der Aktivierung der dicken Filamente eines Halb-Sarkomers und garantieren dadurch die symmetrische Verkürzung der Sarkomer-Einheit. Die Titin-Filamente sorgen für die zentrale Ausrichtung der A-Banden-Einheit. Modifiziert aus Agarkova *et al.* (2003).

Über die Molekularstruktur der M-Bande ist noch relativ wenig bekannt. Zwei Proteine gelten nach heutigem Wissensstand als hauptverantwortlich für die Funktion der M-Bande: Myomesin und das M-Protein.

Myomesin und das M-Protein haben eine ähnliche Domänen-Struktur, die aus einer einzelnen aminoterminalen Domäne gefolgt von 12 Fibronectin-type III (Fn)-like- und Immunoglobulin-type II (Ig)-like-Domänen besteht.

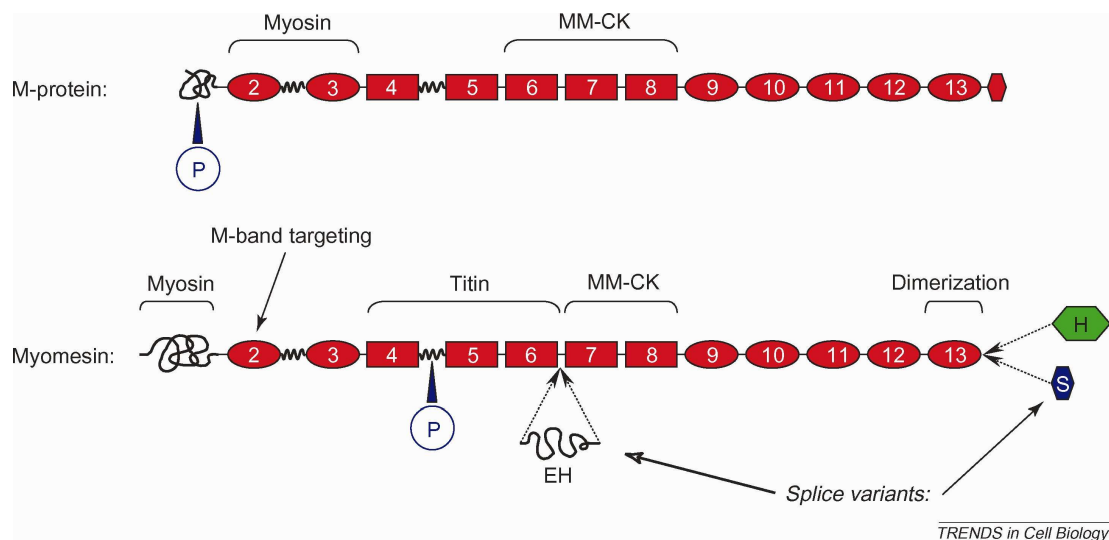


Abbildung 1.8: Schematische Darstellung der M-Banden-Hauptproteine: M-Protein und Myomesin. Der Hauptteil beider Proteine ist identisch und besteht aus Immunoglobulin- (Elipsen) und Fibronectin- Domänen (Rechtecke). Myomesin besitzt zwei "Alternative splicing sites". Einer davon befindet sich am C-terminalen Ende. Bei Vögeln gibt es zwei Varianten, die zur Expression von Herz- (H) oder Skelett- (S) Myomesin-Isoformen führen. Beim Säugetier existiert im Gegensatz dazu mit der S- Myomesin-Isoform nur eine Variante in allen Muskeltypen. Die EH-Myomesin-Isoform wird durch Einschließen des EH-Fragments in der Mitte des Moleküls gebildet. Ähnlich dem PEVK-Fragment des Titin-Moleküls ist das EH-Fragment meistens entfaltet und hat auch elastische Eigenschaften. Aus Agarkova und Perriard (2005). Siehe auch 1.3.3.2. Myomesin-Isoformen.

1.3.2.2 Myomesin-, EH-Myomesin- und M-Proteinkorrelation in der M-Bande

Viele Studien beweisen die besondere molekulare Komposition der M-Bande der verschiedenen Muskeltypen (Grove *et al.*, 1985; Grove *et al.*, 1989; Agarkova *et al.*, 2005, 2003, 2000). Die molekulare Komposition der M-Bande kann in einem einfachen Diagramm zusammengefasst werden (siehe Abbildung 1.9).

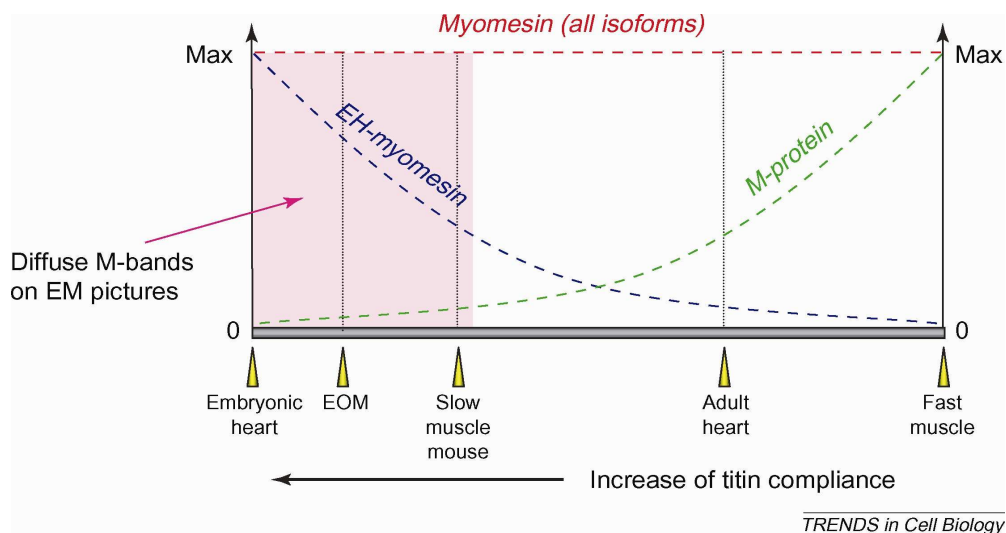


Abbildung 1.9: Molekulare Komposition der M-Bande in verschiedenen Muskeltypen. Die vertikale Achse zeigt die Intensität der Expression der verschiedenen Komponenten der M-Bande. Die horizontale Achse zeigt die verschiedenen Muskeltypen. Myomesin zeigt sich konstant in allen Muskeltypen während M-Protein und EH-Protein eine unterschiedliche Expression zeigen (Agarkova *et al.*, 2005).

In der Abbildung 1.9 stellt die horizontale Achse die verschiedenen Muskeltypen dar; die vertikale Achse stellt die relative Zusammensetzung der M-Banden-Komponenten dar. Myomesin ist ein essentieller Bestandteil der sarkomerischen M-Bande. Es ist bekannt, dass Myomesin die dominierende M-Banden-Komponente ist. Die absolute Menge an Myomesin (alle Isoformen) ist in allen Muskeltypen konstant. Es wird vermutet, dass die Gesamtmenge von Myomesin proportional zur Menge von β -myosin heavy chain (β -MHC) im Sarkomer ist (Agarkova *et al.*, 2003). Im Gegensatz dazu verhält sich die Menge von M-Protein zur Menge von EH-Myomesin-Isoformen umgekehrt proportional. Im embryonalen Herz-Sarkomer enthalten alle Myomesinmoleküle das EH-Fragment, während das M-Protein nicht vorkommt. Die schnellen Muskelfasern zeigen eine molekulare Komposition der M-Bande mit der höchsten Konzentration an M-Protein, während EH-Myomesin nicht vorkommt. Die übrigen Muskeltypen befinden sich zwischen diesen beiden Extremen.

1.3.2.3 Elektronenmikroskopie der M-Bande und M-Banden-Strukturmodelle

Bei der Elektronenmikroskopie einer longitudinalen Myofibrillen-Sektion des M-Banden-Bereichs sind fünf klare Linien zu sehen (siehe Abbildung 1.10): M1, M4/M4' und M6/M6'. M1 entspricht der M-Protein-Expression der verschiedenen Muskeltypen (wie das M-Protein sich in der M-Bande verankert, ist momentan noch unklar). M4/M4' entspricht der Bindung von Myomesin mit der "Muscle-type creatin kinase" (MM-CK). Die Bedeutung der Linien M6/M6' ist nicht bekannt (Sjostrom und Squire, 1997).

Die M4/M4'-Linien kommen in allen Muskeltypen vor, während die elektronenmikroskopische Dichte der M1- und M6/M6'-Linien vom Muskeltyp abhängig ist. Allgemein haben schnelle Muskelfasern ein elektronenmikroskopisches Muster der M-Bande mit drei Linien (M6/M6' fehlt). Demgegenüber haben langsame Muskelfasern ein elektronenmikroskopisches Muster mit vier Linien (M1 fehlt). Fasern mittlerer Geschwindigkeit haben ein Muster mit fünf Linien in der Elektronenmikroskopie der M-Bande (Agarkova und Perriard, 2005).

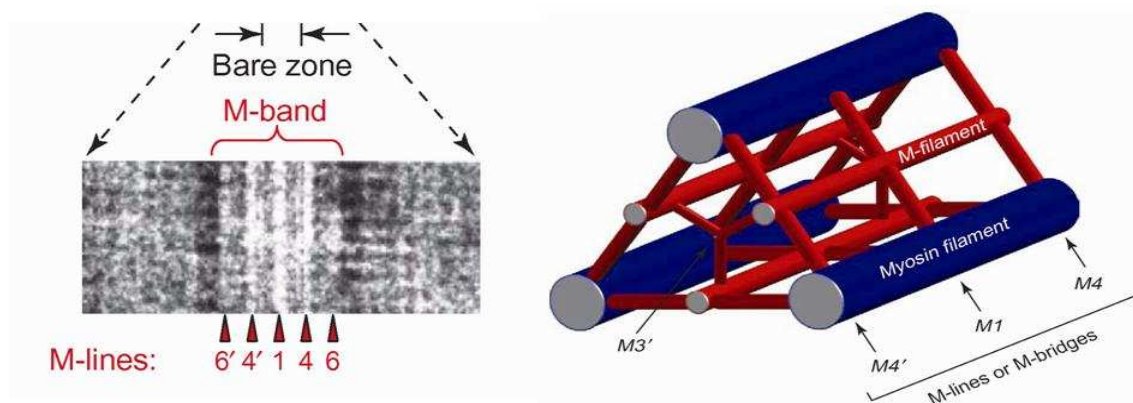


Abbildung 1.10: Links: Details der M-Bande in der Elektronenmikroskopie eines Skelett-Sarkomers. Die M-Linien sind nur mit den Nummern gezeigt (Erläuterung s.Text). (Modifiziert aus Sjostrom *et al.*, 1977). Rechts: von der Elektronenmikroskopie abgeleitetes dreidimensionales Modell der M-Bande. Blau: Dicke Filamente; Rot: strukturelle Elemente der M-Bande. Die drei M-Linien oder M-Brücken entsprechen den deutlichsten beobachteten Linien in der Elektronenmikroskopie M4', M1 und M4 (Erläuterung s.Text).

Mit Hilfe biochemischer und elektronenmikroskopischer Analysen sowie der Beschreibung der verschiedenen Myomesin-Bindungsstellen wurden mehrere M-Banden-Strukturmodelle etabliert (Obermann *et al.*, 1996; 1997; 1998). Das letzte Modell, ein dreidimensionales

Modell der M-Bande, wurde nach der kürzlichen Entdeckung der Myomesin-Interaktion mit sich selbst vorgeschlagen (Lange *et al.*, 2005; siehe auch Text 1.3.3.1. und Abbildung 1.11).

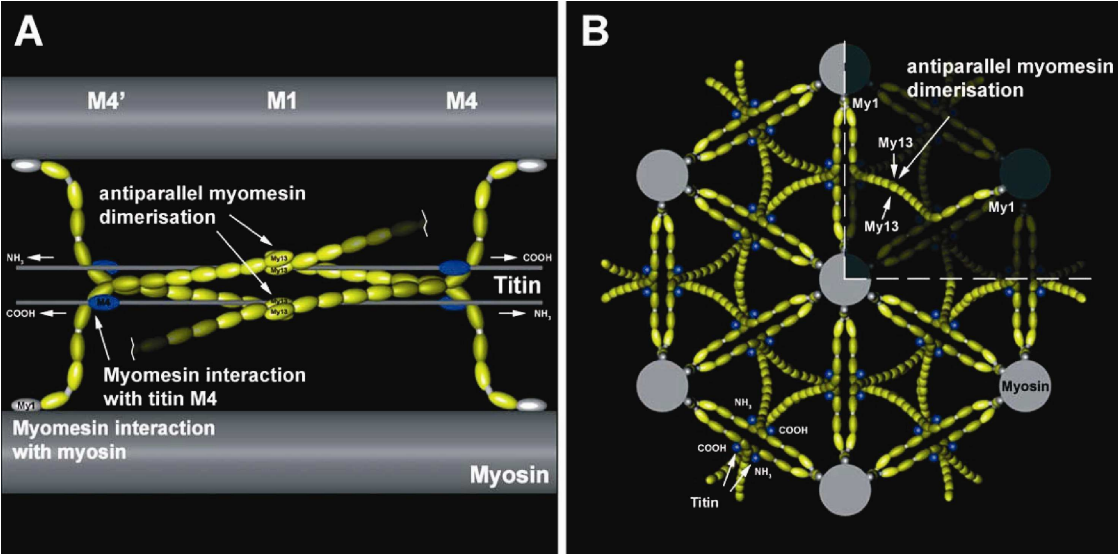


Abbildung 1.11: Dreidimensionales Modell der M-Bande basierend auf den bis jetzt identifizierten molekularen Interaktionen (Lange *et al.*, 2005; Hornemann *et al.*, 2003; Auerbach *et al.*, 1999; Obermann *et al.*, 1997). Gelb: Myomesin; Grau: Myosin und Titin. Immunglobulin-Domänen sind im Myomesin durch einen leichten Schatten dargestellt, Fibronectin-type III-Domänen durch einen dunkleren Schatten. A) Longitudinale Sicht: zwei Myomesin-Filamente, die ein antiparalleles Dimer miteinander bilden. Die Bindungsstellen für diese Dimerisation befinden sich in der C-terminalen Domäne 13 (MYOM 13). Bindungsstellen von Myomesin mit Myosin (grau) und Myomesin mit Titin (blau). Der zentrale Teil von Myomesin zusammen mit zwei antiparallelen Titin-Strängen könnte den in der Elektromikrographie beobachteten M-Filamenten entsprechen (Agarkova und Perriard, 2005). B) Transversale Sicht: Projektion der Molekular-Interaktionen zwischen Myomesin, Titin und Myosin. Die Stellung der Myomesin-Dimere ist im oberen rechten Quadranten hervorgehoben. Abbildung aus Lange *et al.* (2005). Siehe auch Text 1.3.3.1.

1.3.3 Das Protein Myomesin

Das Myomesin-Gen (*MYOM*), das sich auf Chromosom 18p11.31-p11.32 befindetet (Speel *et al.*, 1998), ist aus 38 Exons und 37 Introns zusammengesetzt. *MYOM* umfasst ungefähr 105 kb von DNA (Steiner *et al.*, 1999) und kodiert für ein 185 kDa großes Protein: Myomesin (Grove BK *et al.*, 1998).

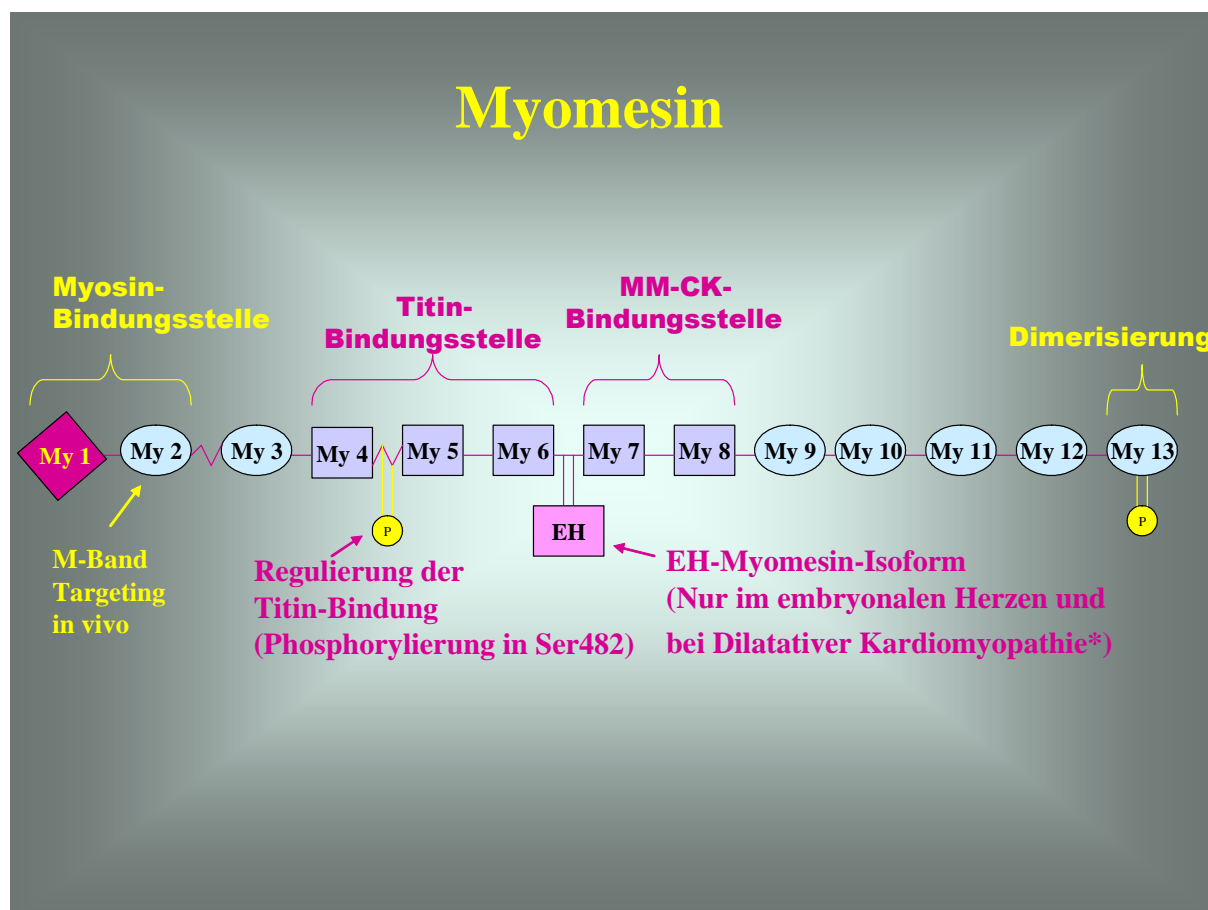


Abbildung 1.12: Eigene Graphik. EH-Myomesin kommt nur im embryonalen Herz und bei Patienten mit Dilatativer Kardiomyopathie vor (Bertoncini *et al.*, 2005; Lange *et al.*, 2006).

Myomesin ist das wichtigste Brückenmolekül der M-Bande, es wurde in der gestreiften Muskulatur aller untersuchten Wirbeltiere gefunden. Es lässt sich in seinem ausgereiften Muster nachweisen, sobald sich die ersten Myofibrillen während der Myofibrillogenese gruppieren. Die Myomesin-Konzentration im Sarkomer bleibt in allen Typen der gestreiften Muskulatur ungefähr konstant. Im Gegensatz dazu werden die anderen M-Banden-Proteine wie M-Protein oder die EH-Myomesin-Isoform nicht in allen Muskeltypen exprimiert und die Konzentrationen in den verschiedenen Muskeltypen sind nicht konstant (Agarkova *et al.* 2003).

1.3.3.1 Myomesin-Bindungsstellen

Myomesin bindet wichtige funktionelle Proteine des Sarkomers (siehe Abbildungen 1.11 und 1.12):

Myomesin-Myosin-Bindungsstelle

Myosin-Filamente bilden die dicken Filamente und sind für die Kontraktions-/Relaxationsfunktion des Sarkomers verantwortlich. Die Myomesin-Myosin-Bindungsstelle befindet sich für Myosin in seiner zentralen Region und für Myomesin an seiner aminoterminalen Domäne *MYOM 1*. Die Affinität der *MYOM 1*-Domäne des Myomesins ist nicht ausreichend, um die Verbindung zwischen Myosin und Myomesin "in vivo" zu gewährleisten. Die Immunglobuline-like-Domäne *MYOM 2* ist essentiell für den korrekten Einbau des Myomesins in die M-Bande. Die nötigen Informationen für Myomesin, um die korrekte Position im Sarkomer zu finden, befinden sich im *MYOM 2* (Auerbach *et al.*, 1999).

Myomesin-Titin-Bindungsstelle

Das Titin-Molekül, auch "giant protein" genannt, ist eine flexible Faser mit einem Molekulargewicht von 3.7 MDa, die eine sehr wichtige Rolle im Sarkomer spielt. Ähnlich wie Myomesin besteht Titin aus Immunoglobulin- (Ig) und Fibronektin type III (FNIII) - Domänen. Die Titin-Immunoglobulin-Domäne (m4) bindet mit den Myomesin-Domänen *MYOM 4* - *MYOM 6*. Diese Interaktion wird durch eine cAMP-Kinase-abhängige Phosphorylierung vom Serin 482 reguliert (Obermann *et al.*, 1997).

Myomesin-Muscle-type creatin kinase-Bindungsstelle

Die "Muscle-type creatin kinase" (MM-CK) gehört zur Familie der CK-Isoenzyme und besitzt eine Schlüsselfunktion für den zellulären Energieumsatz. MM-CK bindet Isoform-spezifisch mit der M-Bande, wo sie ein effizientes intramyofibrilläres System zur ATP-Regeneration darstellt. Dieses wird für die auf beiden Seiten der M-Bande benachbart gelegene Aktin-aktivierte Myosin-ATPase benötigt. Vier MM-CK-spezifische und hochkonservierte Lysin-Reste sind für die Interaktion von MM-CK mit Myomesin verantwortlich. Die jeweilige Myomesin-Bindungsstelle wurde in der zentralen Region des Moleküls identifiziert (*MYOM 7- MYOM 8*) (Hornemann *et al.*, 2003).

Myomesin-Myomesin-Bindungsstelle

Vor kurzem wurde eine Interaktion von Myomesin mit sich selbst beschrieben. Myomesin kann durch die Interaktion der Myomesin-Moleküle antiparallele Dimere bilden. Die Bindungsstellen befinden sich in der C-terminalen Domäne 13 (*MYOM 13*). Dieses neue Modell schlägt vor, dass Myomesin ähnlich wie α -Actinin in der Z-Scheibe die kontraktile Filamente in der M-Bande quervernetzt. Die Myomesin-Dimerisierung ermöglicht die Etablierung eines neuen dreidimensionalen Modells für die M-Banden-Struktur (Lange *et al.*, 2005).

1.3.3.2 Myomesin-Isoformen

Es gibt verschiedene Varianten des Myomesins, die durch alternatives Splicing kontrolliert und exprimiert werden.

A) S-Myomesin ist die Variante, die in allen Muskeltypen (Skelett- und Herzmuskel) aller untersuchten Wirbeltiere vorkommt.

B) EH-Myomesin wurde erst als Skelemin beschrieben (Price *et al.*, 1993). Später wurde bewiesen, dass dieses Protein eine Myomesin-Isoform ist, was zu seiner Umbenennung in EH-Myomesin führte. EH-Myomesin ist eine durch Splicing entstandene Variante, die nur im embryonalen Herz vorkommt. Nach der Geburt vermindert sich die Expression dieser Isoform sukzessive bis zum vollständigen Verschwinden. Bei Patienten, die unter Dilatativer Kardiomyopathie leiden, kann es zur Re-Expression dieser Isoform kommen (Bertoncini *et al.*, 2005; Lange *et al.*, 2006). Das ungefähr 100 Aminosäuren umfassende EH-Fragment ist zwischen den Domänen *MYOM* 6 und *MYOM* 7 lokalisiert und besitzt eine Serin- und Prolin-reiche Domäne, die Ähnlichkeiten mit dem PEVK-Fragment von Titin hat (Bertoncini *et al.*, 2005).

C) H-Myomesin ist eine durch Splicing entstandene Variante, die nur im Herzen von Vögeln vorkommt. Dafür lässt sich das S-Myomesin bei Vögeln ausschließlich im Skelettmuskel nachweisen.

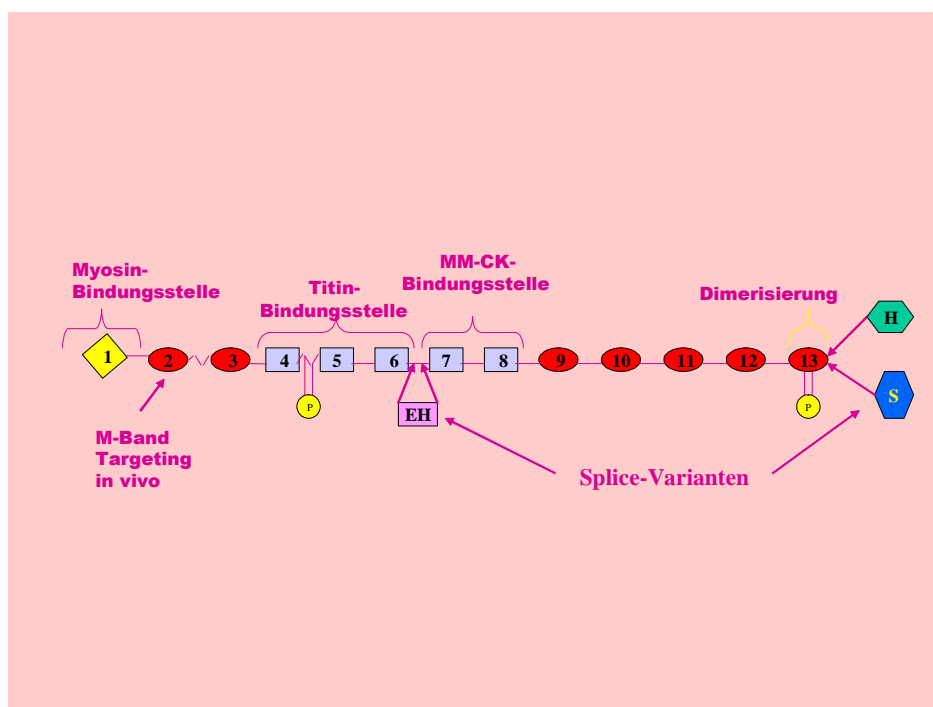


Abbildung 1.13: Myomesin-Splice-Varianten oder Myomesin-Isoformen. Eigene Graphik. Modifiziert aus Agarkova und Perriard (2005). Erläuterung siehe Text.

2. Material und Methoden

2.1 Klinische Evaluation

Insgesamt wurden 410 HCM-Patienten und 307 Kontrollen der Charité/Franz-Volhard-Klinik (Berlin) in dieser Studie untersucht. Alle Patienten hatten eine Einwilligung zur wissenschaftlichen Untersuchung ihrer DNA gegeben. Ein positives Votum der zuständigen Ethikkommission lag vor. Die Patienten wurden auf der Grundlage ihrer medizinischen Vorgeschichte, der körperlichen Untersuchung, zweidimensionaler und M-Mode-Echokardiographien, EKG, Holter-EKG sowie Herzkatheterisierung bewertet. Die Diagnose der HCM basiert auf den Empfehlungen der WHO. Hauptkriterien sind ein verdicktes Interventrikularseptum (> 13 mm) in Abwesenheit anderer potentieller Hypertrophiegründe (z.B. Hypertonie, Arteriosklerose, etc) sowie größere EKG-Veränderungen wie negative T-Wellen, pathologische Q-Wellen oder Schenkelblocks. Die echokardiographische Evaluation wurde ohne vorherige Kenntnis der genetischen Ergebnisse durchgeführt. Eine Koronararterienkrankung als Ursache der eingeschränkten linksventrikulären Funktion wurde mittels selektiver Koronarangiographie ausgeschlossen.

2.2 Genetische Analyse

Überblick

Der Ansatz dieser Untersuchung bestand darin, im Kollektiv der HCM-Patienten nach Mutationen im Kandidatengen Myomesin zu screenen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Exons 7, 8, 9, 22, 23, 24, 25 und 26 des *MYOM*-Gens untersucht.

Die DNA der Patienten wurde aus deren Blut extrahiert und bei -20°C aufbewahrt. Die DNA-Fragmente des Myomesin-Gens jedes einzelnen Patienten wurden mittels Polymerase-Chain-Reaction (PCR) amplifiziert.

Die amplifizierten Fragmente wurden mittels Single-Strand-Conformation-Polymorphism-(SSCP) Analyse untersucht. Traten auffällige Bandenmuster in der SSCP auf, wurden die DNA-Fragmente der entsprechenden Patienten in einer automatischen Sequenzierung auf Mutationen hin untersucht.

Die Proben wurden mit Hilfe des automatischen DNA-Sequenzers ABI Prism 3100-Avant Genetic Analyzer (*Applied Biosystems*) sequenziert.

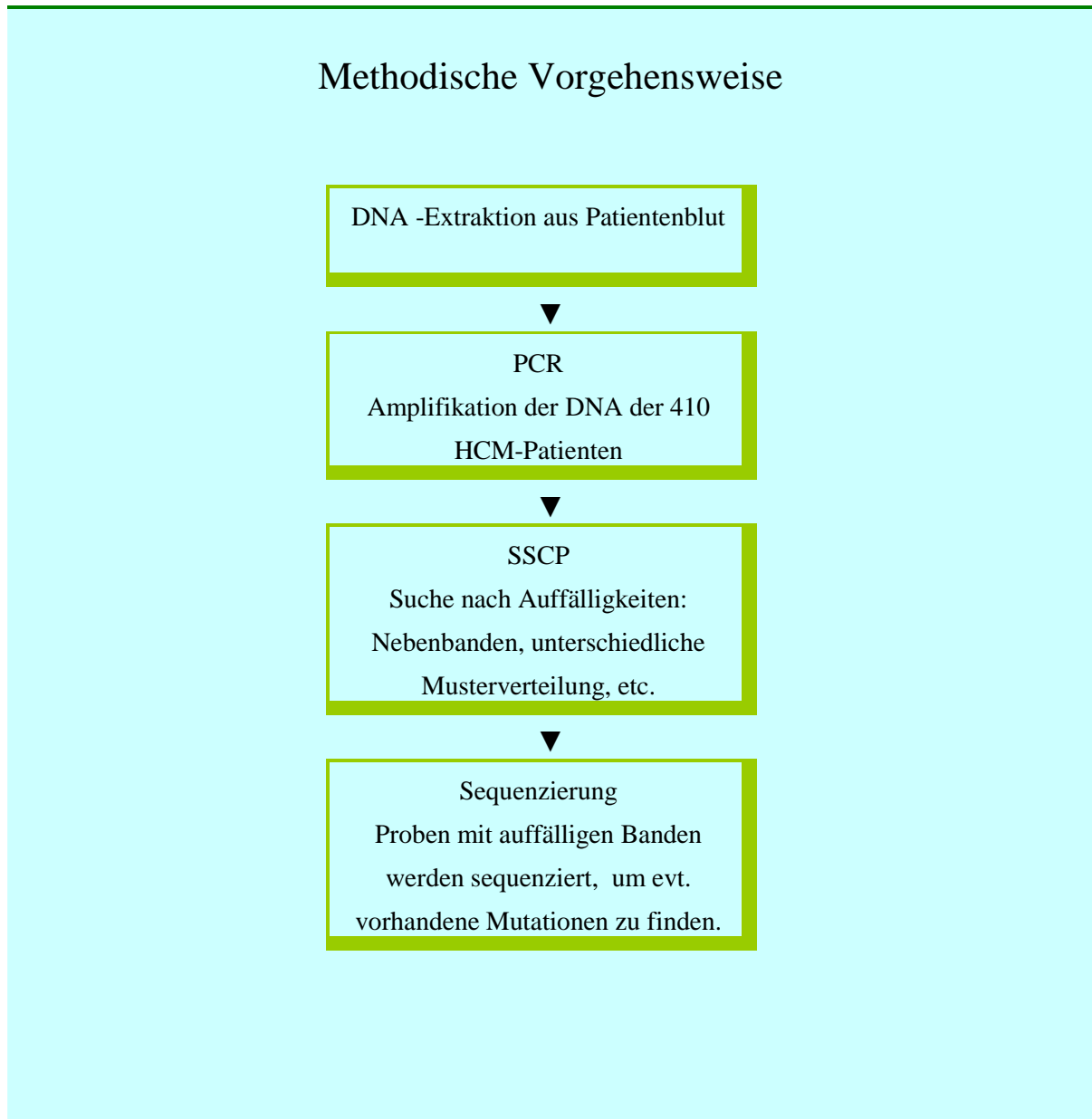


Abbildung 2.1: Darstellung des methodischen Ablaufs der Untersuchung. PCR: Polymerase-Chain-Reaction; DNA: desoxyribo nucleic acid bzw. Desoxyribonukleinsäure; SSCP: Single-Strand-Conformation-Polymorphism.

2.2.1 DNA-Extraktion

Die DNA der Patienten des Kollektivs wurde mittels einer Standard-DNA-Extraktion extrahiert. Dabei kam die Methode nach Lahiri zur Anwendung (Lahiri *et al.*, 1991). Anders als bei anderen Techniken werden bei dieser Methode die Proteine unter Zuhilfenahme von Natriumchlorid entfernt. Der Vorteil dieser Methode besteht darin, dass keine toxischen Substanzen verwendet werden.

Die Arbeitsschritte waren wie folgt:

1. 5ml der Blutprobe, 5ml Puffer TKM1 (10 mM Tris, pH 7,6; 10 mM MgCl₂; 2 mM EDTA) und 100 µl Triton X-100 wurden vermischt und 20 Minuten bei 2500 U/min zentrifugiert.
2. Das Pellet wurde in 800 µl Puffer TKM2 (10 mM Tris, pH 7,6; 10 mM KCL, 10 mM MgCl₂; 0,4 mM NaCl, 2 mM EDTA) und 50 µl 10% SDS resuspendiert, vermischt und 10 Minuten bei 55°C im Wasserbad inkubiert.
3. 100 µl 5 M NaCl wurden hinzupipettiert, vermischt und 5 Minuten bei 1200 U/min zentrifugiert. Der Überstand mit der DNA (ca. 1 ml) wurde in ein neues Gefäß überführt und mit dem doppelten Volumen reinen Alkohols (ca. 2 µl) bei Raumtemperatur vermischt. Das Gefäß wurde mehrmals gedreht, bis die DNA sichtbar wurde.
4. Die DNA wurde in ein Gefäß überführt, das 1ml eiskaltes 70% Ethanol enthielt. Das Gefäß wurde 5 Minuten bei 1200 U/min bei 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde 10 min in einer Vakuumzentrifuge getrocknet und dann in 500 µl Tris-Puffer (10 mM, pH 8,0) 15 Minuten bei 65°C resuspendiert. Nun konnte es als DNA-Stammlösung verwendet werden.
5. Die DNA-Stammlösung wurde auf ein 1,5%iges Agarose-Gel aufgetragen und die Konzentration bestimmt.

Es wurde eine Arbeitslösung mit einer Konzentration von ca. 25 ng/ml angesetzt.

2.2.2 Amplifizierung der Myomesin-Exons mittels Polymerase-Chain-Reaction (PCR)

Polymerase-Chain-Reaction (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion (Polymerase-Chain-Reaction; PCR) wurde 1984 von K. Mullis entwickelt und erstmals von Saiki und Mitarbeitern 1985 beschrieben (Saiki *et al.*, 1985). Diese Methode der DNA-Amplifikation ist heute in weiten Teilen der Molekulargenetik, der medizinischen Forschung und Diagnostik etabliert. Die PCR ermöglicht es, aus geringen Mengen genetischen Materials (DNA, RNA) innerhalb kurzer Zeit große Mengen einer spezifischen Gensequenz zu amplifizieren.

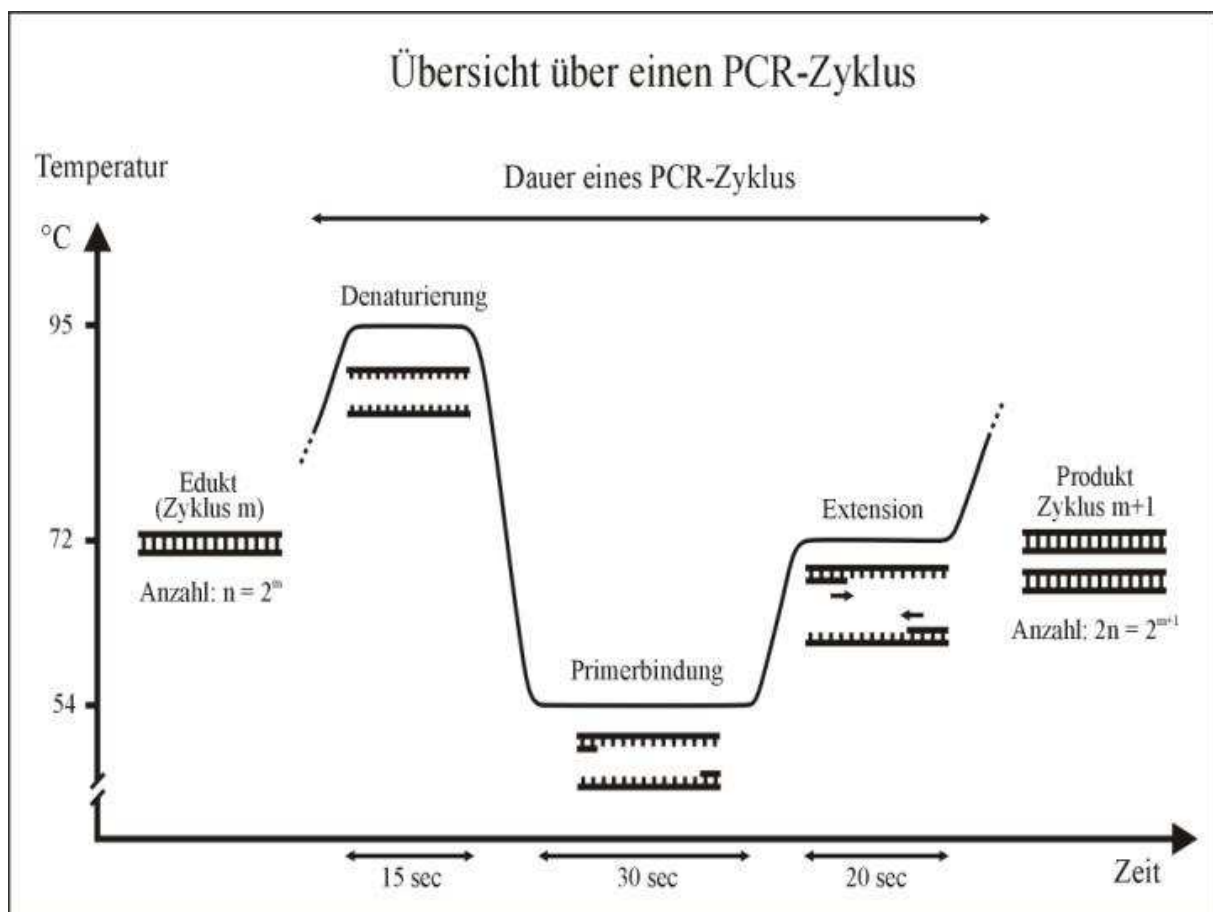


Abbildung 2.2: Darstellung des PCR-Prinzips.

Das typische PCR-Programm besteht aus einem Denaturierungsschritt, einem Annealingsschritt und einem Elongationsschritt. Denaturiert wird bei 94 °C, dabei trennen sich die beiden Stränge der Template-DNA. Anschließend wird die Temperatur auf 55°C gesenkt, so dass es zur Hybridisierung der im Überschuss vorhandenen Oligonukleotidprimer an die einzelsträngige Template-DNA kommt. Danach wird die Temperatur auf 72°C, das Temperaturoptimum der Taq-Polymerase, erhöht, wobei der Primer verlängert wird, bis

wieder eine doppelsträngige DNA vorliegt, die der ursprünglichen Template-DNA exakt gleicht. Weil die Komplementierung an beiden Strängen der Template-DNA abläuft, hat man in einem Zyklus die Zahl der Template-DNAs verdoppelt. Wiederholt man den Zyklus, hat man anschließend die vierfache Menge usw.

Um eine spezifische Gensequenz zu amplifizieren, benötigt man Oligonukleotid- Primer (Tabelle 2.1.), die als Startsequenzen spezifisch an den äußeren Enden des zu amplifizierenden genetischen Abschnitts (Sequenz) binden. Sie stellen damit das für die enzymatische Aktivität der DNA-Polymerase notwendige freie 3'-OH-Ende zur Verfügung. Diese kann so mit der DNA-Replikation beginnen. Für ein optimales Reaktionsmilieu dieses Enzyms werden vier Nukleotidtriphosphate (dATP, dGTP, dCTP und dTTP), eine Pufferlösung, die den optimalen pH-Wert der Reaktionslösung herstellt, und eine thermostabile DNA-Polymerase, die sog. Taq-Polymerase aus dem thermophilen Bakterium *Thermophilus aquaticus*, benötigt. (Tabelle 2.2.).

	Forward Primers	Reverse Primers
Exon 7	5'TTGTTTTCTTCAAAGTGTGT3'	5'TTATTTTCAGCATTATGGGCT3'
Exon 8	5'CTGCTTTCTGCCTGTGCTTA3'	5'TTCCACCAGCTCCGATAAAC3'
Exon 9	5'ATAGAAAAGGCTAAGGAGAG3'	5'TTTGGCTTCAGTGTACTAAA3'
Exon 22	5'ACTTGGTTGCTTTCCTCCAC3'	5'GCTCACCTCATTCTCCTACA3'
Exon 23/24	5'GGAGGTGTCCAGATGAAAGG3'	5'ATTCCAGAAGTTGCTGCCTA3'
Exon 25	5'GCTACATTGTCATTTCCATT3'	5'TATCCACATCCACATAAGGC3'
Exon 26	5'TGTTGTCATTCCAAGTAAAA3'	5'ATTGAAGGGAGTAGCAAAGC3'

Tabelle 2.1. Oligonukleotid-Primer, die für die Amplifizierung des Myomesin-Exons verwendet wurden. Jeder Primer ist 20 bp lang, die entsprechenden PCR-Produkte bestehen aus etwa 200-400 bp. Dies ist eine optimale PCR-Produkt-Größe für eine hervorragende Sensitivität der Mutationsdetektion mittels SSCP und Sequenzierung. Die Primer schließen vor und hinter dem gewünschten Exon etwa 30-40 bp ein. Eine 21-M13 Sequenz (5' TGTAACACGACGGCCAGT 3') und eine M13 Sequenz (5' CAGGAAACAGCTATGACC 3') wurden jeweils in den Vorwärts- und Rückwärts-Primer integriert, um eine direkte Cycle-Sequenzierung mit den gleichen Fluoreszenzmarkern für jedes Exon zu ermöglichen. Exon 23 und 24 wurden aufgrund ihrer geringen Länge (Exon 23: 107 bp und Exon 24: 45 bp) und ihrer engen Nachbarschaft (118 bp Entfernung) gemeinsam in einem Stück mit einem Vorwärts- und Rückwärts-Primer amplifiziert.

Die Oligonukleotid-Primer wurden mit Hilfe der Software OLIGO designed und von BioTeZ hergestellt.

PCR/Ansatz	Konzentration	Exons: 7,9,22,23/24,25,26	Exon: 8
		Vol (µl)	
Aqua dest	-	17´4	17´8
PCR Buffer	10x, Appl Bios	2´5	2´5
Mg Cl	25 mM, Appl Bios	1´5	1´5
Forward Primer	5 pmoles/µl, BioteZ	1	0´8
Reverse Primer	5 pmoles/µl, BioteZ	1	0´8
dNTP	20mM, ByoZym	0´3	0´3
Taq polymerase	5U/µl, Appl Bios	0´3	0´3
DNA	25 ng/µl	1	1

Tabelle 2.2. Komponenten im PCR-Ansatz für zu untersuchende Myomesin-Exons. Gesamtvolumen von 25 µl PCR-Mix für eine Probe. Appl Bios: Applied Biosystem; dNTP: desoxynukleotidtriphosphate; Vol: Volumen.

Dieses DNA-Polymerase-Reaktionsgemisch wurde in einem Thermocycler (Peltier Thermal Cycler, MJ Research Inc; Uno-Thermoblock, Biometra) angesetzt. Bei der Suche nach den geeigneten PCR-Bedingungen bzw. einer PCR-Optimierung für jedes einzelne Myomesin-Exon wurden folgende Ergebnisse erzielt:

	Temperatur (° C)	Laufzeit
	Initial-Denaturierung	90° C
	94° C	1 Min.
	35-38 Zyklen* für:	
Annealing	Primer-spezifische Temperatur (55- 65 °C)*	30 Sek.
Elongation	72 ° C	1 Min.
Denaturierung	92 ° C	15 Sek.
Final Annealing	Primer-spezifische Temperatur (55- 65 °C)*	30 Sek.
Final Elongation	72 ° C	5 Min.

Tabelle 2.3: PCR-Optimierung der zu untersuchenden Myomesin-Primer. *Die Annealing-Temperatur sowie die Zahl der Zyklen sind Primer-spezifisch (siehe Tabelle 2.4.).

	Annealingtemperatur	Zahl der Zyklen
Exon 7	55 °C	38
Exon 8	64 °C	38
Exon 9	61 °C	35
Exon 22	65 °C	35
Ex 23/24	65 °C	35
Exon 25	63 °C	35
Exon 26	59 °C	35

Tabelle 2.4: PCR-Optimierung. Die Annealing-Temperatur ist die Temperatur, bei der sich die Primer an die DNA-Stränge binden. Danach fängt die Taq-Polymerase bei 72°C an, Nukleotidtriphosphate (dNTPs) zu addieren. Dies ermöglicht die DNA-Elongation und die gewünschte DNA-Amplifikation.

Die Qualität der PCR-Produkte wurde mittels Agarosegel-Elektrophorese getestet. In dieser Untersuchung wurden Agarosegele mit einer 3%igen Konzentration verwendet. Die Laufzeit der Elektrophorese variiert zwischen 25 und 40 Minuten und findet unter Verwendung einer 80 mV- Quelle statt.

Agarose 3%, gramm	1xTBE-Puffer (ml)	Ethidium Bromid 5%, µl
3	100	5
0,60	20	1

Tabelle 2.5: Beispiel der Herstellung eines Agarosegels für Elektrophorese. TBE Puffer: Tris-HCl-Borat-Ethylendiamintetraacetat-Puffer.

2.2.3 Single-Strand-Conformation-Polymorphism (SSCP)

Das Screening mittels SSCP ist eine sensitive Methode zur Mutationsdetektion, die auf der Konformationbildung der DNA-Einzelstränge beruht. Die SSCP-Analyse gehört zur Gruppe der unspezifischen Detektionsverfahren von Sequenzvariationen und ist daher für ein großes Screening einer größeren Probenzahl geeignet. Sie gibt keine Auskunft über die Art des Sequenzunterschiedes, sondern dient der Eingrenzung derjenigen Proben, die mit einer spezifischen Analyse (z.B. Sequenzierung) weiter untersucht werden müssen (Nataraj *et al.*, 1999).

Die Sensitivität der SSCP für Mutationen liegt bei ca. 80-90%, wenn die Fragmentlänge der vorher amplifizierten DNA-Fragmente nicht mehr als 400 bp beträgt. Bei einer Fragmentlänge zwischen 150-200 bp lag die Sensitivität von entdeckten Mutationen in mehreren Studien zwischen 90-95% (Fan *et al.*, 1993; Glavac *et al.*, 1993; Hayashi *et al.*, 1993; Sheffield *et al.*,

1993; Ravnik-Glavac *et al.*, 1994) und sank bei einer Fragmentlänge < 135 bp auf 78% (Sheffield *et al.*, 1993).

Um diese Sensitivität noch zu steigern, wurden beim Screening für jedes Exon jeweils zwei unterschiedliche Laufbedingungen gewählt, die sich in Temperatur, Laufzeit und Zusammensetzung des Gels unterschieden.

2.2.3.1 Verfahren der Single-Strand-Conformation-Polymorphism (SSCP)-Analyse

Die SSCP-Analyse besteht aus Amplifikation eines DNA-Abschnittes mit Hilfe einer PCR, nachfolgender Denaturierung des Amplifikats und dessen Elektrophorese auf einem nicht-denaturierenden Acrylamidgel (Orita *et al.*, 1989).

Die Gießvorrichtung eines SSCP-Gels besteht aus zwei Glasplatten der Größe 26x20 cm (Amersham Bioscience). Eine der Platten hat 26 Slotformer aus DYMO-Klebeband. Eine spezielle Plastikfolie (Gel-Fix von Serva) wird zwischen die Glasplatten gefügt, um als Trägerfolie für das Gel zu dienen. Die Komponenten für das jeweilige Gel werden vermischt und es werden zur Polymerisation 24 µl 99% TEMED und 48 µl Ammoniumpersulfat hinzugegeben. Die Gellösung wird zwischen die Trägerfolie und die Glasplatte mit den Slotformern gegossen. Die Polymerisation dauert dann ca. eine Stunde.

Die zu untersuchenden PCR-Produkte werden mit Formamidpuffer (0,9g/ml Formamid; 10mM NaOH; 11mM EDTA) im Verhältnis 1:1 bzw. 1:2 gemischt. Danach erfolgt die Denaturierung dieser Proben bei 95°C für 5 Minuten. Durch schnelles Abkühlen lagern sich nach der Denaturierung nur einige der Einzelstränge wieder zu Doppelsträngen zusammen. So lassen sich bei der Elektrophorese Einzelstränge sowie Doppelstränge parallel darstellen und analysieren. Die Einzelstränge nehmen jeweils eine Sekundärstruktur an, die sequenzabhängig und weniger kompakt gefaltet ist, als die der Doppelstränge. Dadurch wandern die Einzelstränge deutlich langsamer als die Doppelstränge (Abbildung 2.3). Je nach Primärsequenz bilden die Einzelstränge eine oder mehrere dreidimensionale Strukturen (Konformationen) aus. Diese sind spezifisch und bestimmen das Wanderverhalten während der Elektrophorese. Selbst Sequenzunterschiede von nur einer Base können in den meisten Fällen anhand des divergierenden Laufverhaltens der Einzelstränge unterschieden werden. Es können Zusatzbanden auftreten oder die Laufstrecke der Banden kann sich ändern (Nataraj *et al.*, 1999). Gelegentlich treten bei heterozygoten Merkmalsträgern zusätzlich zu den auffälligen Einzelstrangbanden auch Heteroduplices auf. An der Stelle der Mutation befindet sich auf jedem der amplifizierten Allele eine unterschiedliche Base. Beim schnellen Abkühlen nach der Denaturierung lagern sich Kopien der Allele zufällig aneinander. So entstehen neben homozygoten auch heterozygote Doppelstränge. Falls diese Gruppe ein unterschiedliches Wanderverhalten in der SSCP-Analyse hat, stellen sich zwei verschiedene Doppelstrangbanden dar (Abbildung 2.3; Mutation B).

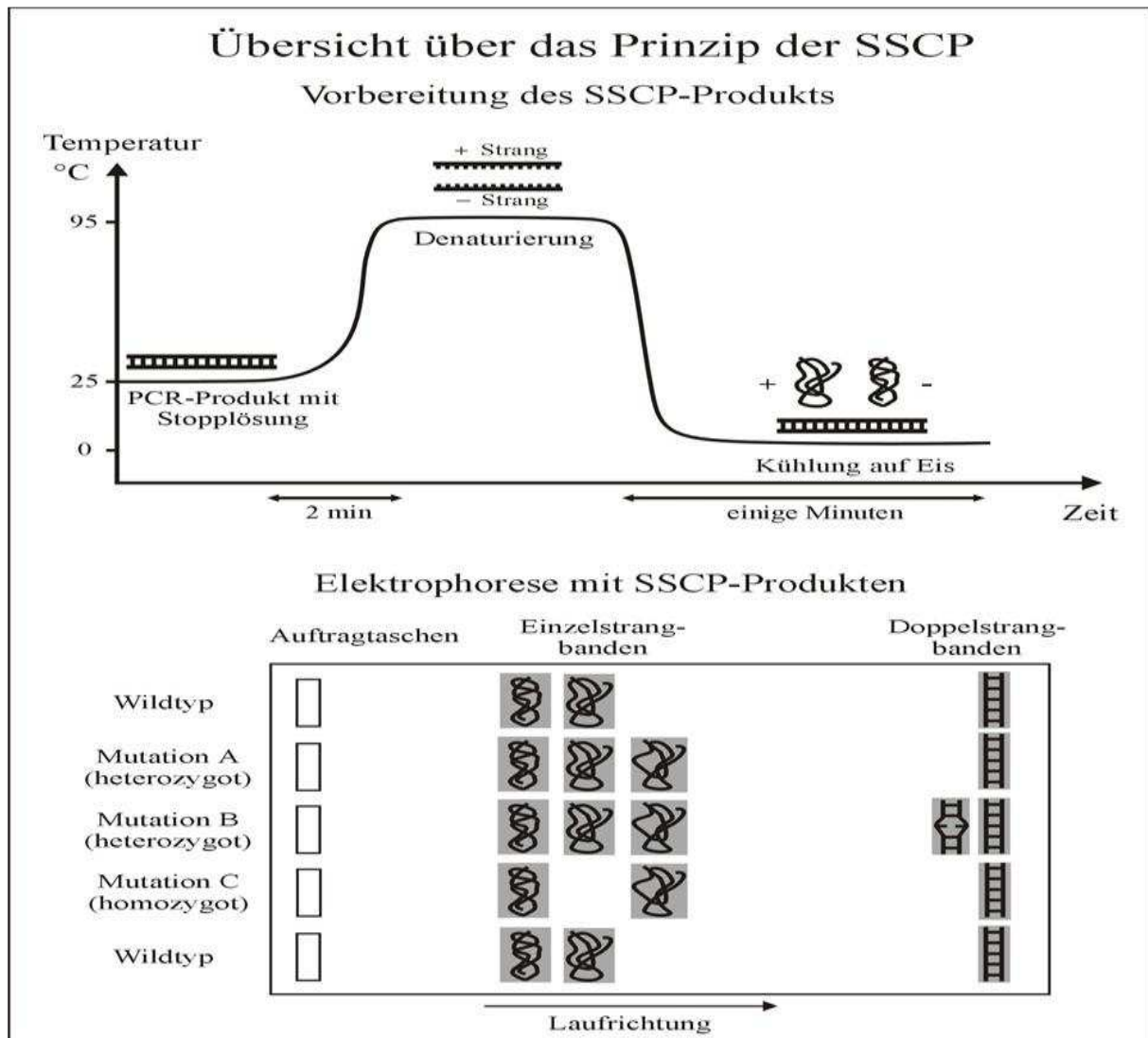


Abbildung.2.3: Darstellung des Prinzips der SSCP-Analyse (Erläuterung s. Text). Mutation A zeigt nur Veränderungen der Einzelstränge, Mutation B zusätzlich einen Heteroduplex.

In dieser Untersuchung wurden die Proben in die Elektrophoresekammern (MultiphorII, Pharmacia) aufgetragen. Ein Gellauf wurde mit 35 Watt durchgeführt. Nach dem Lauf wurden die DNA-Bandenmuster mittels Silberfärbung sichtbar gemacht. (siehe nachfolgende Tabelle).

Schritt (Lösung)	Zusammensetzung	Zeit
Fixierlösung	Eisessig 25 ml Auffüllen mit Aqua dest auf 250 ml	20 Min.
Waschen	Aqua dest	3x 2 Min.
Silberfärbung	1% Silbernitratlösung 25 ml 37 % Formaldehyd 0,25 ml Auffüllen mit Aqua dest auf 250 ml	20 Min.
Waschen	Aqua dest.	30 Sek.
Entwicklerlösung	Natriumcarbonat 6,25 g 37 % Formaldehyd 0,25 ml 2 % Natriumthiosulfat 0,25 ml Auffüllen mit Aqua dest auf 250 ml	Bis Banden sichtbar werden
Stopplösung	Glycin 5g 0,5 M EDTA 18,8 ml Auffüllen mit Aqua dest auf 250 ml	10 Min.
Konservierungslösung	99,5 % Glycerol 25 ml Auffüllen mit Aqua dest auf 250 ml	10 Min.

Tabelle 2.6: Darstellung der durchgeführten Schritte für die Silberfärbung der SSCP-Gele. EDTA: Ethylendiamintetraacetat.

Zuletzt erfolgt die Trocknung der Gele auf einer Glasplatte, die mit Cellophanfolie (Cotech) bedeckt ist. Nach einer Trocknung von 24-48 Stunden können die Gele ausgeschnitten und ausgewertet werden. Proben mit auffälligem Bandenmuster werden dann einer automatischen Sequenzierung zugeführt.

2.2.3.2 Optimierung der Single-Strand-Conformation-Polymorphism (SSCP)-Analyse

Diese Technik sollte für jedes Exon optimiert werden, da das Wanderungsverhalten für jedes PCR-Fragment unterschiedlich ist.

Bei der SSCP-Optimierung der untersuchten Myomesin-Exons wurden folgende Ergebnisse erzielt:

Exons	SSCP-Bedingung 1	SSCP-Bedingung 2
7	PAA 10%, 20°C, 70 Min	MDE, 15°C, 50 Min
8	PAA 10%, 10°C, 70 Min	FA 10%, 5°C, 60 Min
9	PAA 10%, 20°C, 70 Min	PAA 10 %, 15°C, 75 Min
22	PAA 10%, 15°C, 70 Min	FA 10%, 10°C, 50 Min
23/24	PAA 10%, 15°C, 70 Min	FA 10 %, 10°C, 50 Min
25	PAA 10%, 20°C, 70 Min	FA 10 %, 10°C, 50 Min
26	PAA 10 %, 15°C, 70 Min	FA 10%, 10°C, 50 Min

Tabelle 2.7: SSCP-Optimierung der gewählten Myomesin-Exons. Die Tabelle zeigt beide unterschiedlichen SSCP-Bedingungen (Geltyp, Lauftemperatur und Laufzeit), die für jedes Exon verwendet wurden. In der nächsten Tabelle wird die Zusammensetzung jedes einzelnen Gels gezeigt. PAA: Polyacrylamid-Gel; FA: Formamid-Gel; MDE: Mutation Detection Enhancement-Gel.

SSCP- Gele	Komponenten	Vol (ml)
PAA 10% Gel	10% PAA- Lösung	1,8
	10x TBE- Lösung	7,8
	dH ₂ O Seralpur	21,4
FA 10% Gel	Formamid	3
	2xMDE- Lösung	7,5
	10xTBE- Lösung	1,8
	dH ₂ O Seralpur	17,8
MDE Gel	2xMDE- Lösung	7,5
	10xTBE- Lösung	1,8
	dH ₂ O Seralpur	20,8

Tabelle 2.8: SSCP-Gel-Komponenten, die für diese Untersuchung verwendet wurden. PAA: Polyacrylamid-Gel; FA: Formamid-Gel; MDE: Mutation Detection Enhancement-Gel.

2.2.4 Automatische DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung dient der genauen Bestimmung der Basenabfolge eines DNA-Abschnitts. Diese Untersuchung wurde mittels eines automatischen Sequenziersystems (Applied Biosystems, ABI Prism 3100-Avant Genetic Analyzer) durchgeführt.

2.2.4.1 Polymerase-Chain-Reaction (PCR)

Zu Beginn der Sequenzierung wurde ein neues PCR-Produkt amplifiziert und die Produktstärke anschließend überprüft. Da die Amplifizierung der Taq-Polymerase eine gewisse Fehlerquote aufweist (2×10^{-4} pro Zyklus und Nukleotid (Saiki *et al.*, 1988)), besteht zumindest theoretisch die Gefahr, dass ein gefundener Sequenzunterschied “künstlich“ durch einen Fehleinbau der Taq-Polymerase entstanden ist. Ein solcher Fehler wird an alle Tochternukleotide weitergegeben und die Anzahl der betroffenen Stränge verdoppelt sich mit jedem Amplifikationszyklus (Saiki *et al.*, 1988). Allerdings kann nur ein sehr früh auftretender Fehleinbau signifikante Auswirkungen auf das Endprodukt haben, da schon zu Beginn der PCR eine hohe Zahl von DNA-Kopien aus der Vollblutextraktion vorliegt. Um das Risiko einer “künstlichen“ Mutation weiter zu reduzieren, wurde vor jeder Sequenzierung eine neue PCR mit genomischer DNA durchgeführt und nicht alte PCR-Produkte reamplifiziert.

2.2.4.2 Cycle-Sequencing

Das Cycle-Sequencing ist eine lineare Amplifikation mit nur einem Primer und dient dem Einbau von Fluoreszenzmarkern. Für jede der vier Basenarten wird eine unterschiedliche Farbe verwendet. Der Einbau eines Markers führt gleichzeitig zum Kettenabbruch der DNA-Polymerase, d.h. jeweils am Ende der unterschiedlich langen Stränge befindet sich eine markierte Base. Die nächste Tabelle zeigt den Reaktionsansatz des Cycle-Sequencing:

Komponente	Volumen (μ l)
BigDye Ready Reaction Mix	4
5x Sequenzierungspuffer	2
Vorwärts- und Rückwärts-Primer	1
HPLC-Wasser	12
PCR- Produkt	1

Tabelle 2.9: Reaktionsansatz des Cycle-Sequencing für eine Probe. Das BigDye® Terminator-Kit, bestehend aus BigDye Ready Reaction Mix und 5x Sequenzierungspuffer, setzte sich aus folgenden Komponenten zusammen: A-, C-, G-, T-Dye Terminator; dGTP, dATP, dCTP, dTTP; Tris-HCl (pH 9,0); Magnesiumchlorid; hitzestabile Pyrophosphatase; AmpliTaq DNA Polymerase. HPLC-Wasser: Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie-Wasser.

Es wurden sowohl der Vorwärts-, als auch der Rückwärts-DNA-Strang sequenziert, so dass zwei Ansätze pro DNA-Probe pipettiert werden mussten. Die Primer waren komplementär für das M13 DNA-Fragment, so dass für alle Exons die gleichen Primer verwendet wurden. Die Reaktionsansätze wurden kurz zentrifugiert und in einen bereits auf 96 °C vorgeheizten Thermocycler gestellt. Die nächste Tabelle zeigt das verwendete Thermocycler-Programm:

Zyklenanzahl	Temperatur (°C)	Zeit (min)	Reaktion
1	96	1:00	Anfangsdenaturierung
1	96	0:10	Zyklische Denaturierung
1	50	0:05	Primerannealing
1	60	4:00	Primerextension
1	20	∞	Abschließende Primerextension

Tabelle 2.10: Thermocycler-Programm für das Cycle-Sequencing

2.2.4.3 Ethylendiamintetraacetat (EDTA)-Ethanol-Fällung

In diesem Schritt wurden die Sequenzieransätze gereinigt. Dazu wurde zunächst die Kühlzentrifuge zum Vorkühlen eingeschaltet. Die Sequenzierproben wurden in 1,5 ml Eppendorfgefäße umpipettiert und jeweils 2,5 µl 125 mM EDTA, 25 µl 95 %iges Ethanol und 1,0 µl Sequenzierfarbstoff hinzugegeben. Anschließend wurde für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und dann für 30 Minuten bei $3000 \times g$ zentrifugiert.

Man erhielt ein Pellet, aufgrund des zugefügten „Sequenzierfarbstoffes“ blau sichtbar, und einen Überstand. Der Überstand wurde verworfen und 60 µl 70 %iges Ethanol zum Pellet gegeben. Dann wurde für 10 Minuten bei $2000 \times g$ zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet für ca. 5 Minuten bei 55 °C im Thermoblock getrocknet.

2.2.4.4 Sequenzierung

Die getrockneten Pellets wurden in 20 µl HI-DI Formamid gelöst. Die Lösung ist dann luftblasenfrei in die Sequenzierplatten pipettiert und diese in den Sequenzierautomaten gestellt worden.

2.2.4.5 Auswertung

Nach Abschluss der Sequenzierung wurden die unsauberen Anfangs- und Endsequenzen herausgeschnitten. Die Auswertung erfolgte durch Vergleich der erhaltenen Sequenz mit der Referenzsequenz mit der GenBank-Nummer NT_010859. Dazu wurde die Software Sequencher™ Version 4.1.2., Gene Codes Corporation ©1991-2000 verwendet.

2.2.5 Restriktionsenzymverdau

Restriktionsenzyme erkennen spezifische Basensequenzen in einer DNA-Doppelhelix und hydrolysieren die Phosphodiesterbindung beider Stränge an spezifischen Stellen. Die resultierenden DNA-Fragmente können durch Gelelektrophorese getrennt und sichtbar gemacht werden (Stryer 1990). Mit Hilfe eines Restriktionsenzymverdaus lassen sich bekannte Sequenzunterschiede eines DNA-Abschnittes nachweisen, sofern durch den Sequenzunterschied eine Enzymschnittstelle hinzukommt bzw. entfällt. Ein Verdau eignet sich zum Screenen einer großen Probenzahl, da er einfach durchführbar ist und seine Ergebnisse eindeutig sind. So können z.B. Mutationen bestätigt oder die Allelfrequenz eines Polymorphismus bestimmt werden.

In dieser Untersuchung wurden die Restriktionsenzyme Dde I, Mwo I und Aci I verwendet. Die nächste Tabelle zeigt den Ansatz des Restriktionsenzymverdaus für jedes Enzym.

	Dde I (3 Units)	Mwo I (1 Unit)	Aci I (3 Units)
<u>Reagenzien Enzymverdau</u>			
Enzym	0,3 µl	0,2 µl	0,3 µl
PCR-Produkt	2 µl	2 µl	2 µl
1 x NBuffer 3	1 µl	1 µl	1 µl
Aqua dest.	6,7 µl	6,8 µl	6,7 µl
Inkubationsbedingungen			
Inkubationszeit (Stunden)	3	2,5	2
Temperatur (°C)	37°C	60°C	37°C
Hitze Inaktivtion	65°C während 20 Minuten	Nein	65°C während 20 Minuten

Tabelle 2.11: Reaktionsansatz (Gesamtvolumen von 10 µl Mix für eine Probe) und Reaktionsbedingungen des Enzymverdaus. Die Reagenzien wurden vermischt und unter den gezeigten Inkubationsbedingungen in den Thermocycler gestellt.

2.2.6 Agarosegelelektrophorese

Zur Darstellung der Bandenmuster des Enzymverdaus wie auch zur Überprüfung der Qualität der PCR-Produkte wurden Elektrophoresen mit Agarosegelen durchgeführt. Zur Sichtbarmachung der DNA wurde das Gel mit Ethidiumbromid versetzt und nach dem Gellauf unter einer UV-Lampe (Transluminator Tl 1 ; Biometra) betrachtet .

In dieser Untersuchung wurden Agarosegele mit einer 3%igen Konzentration verwendet. Zur Herstellung eines 3%igen Gels wurden 0,6 g Agarosepulver mit 20 ml 10x TBE-Puffer

vermischt und in einer Mikrowelle bis zum Schmelzen der Agarose vermischt. Danach wurde 1 µl Ethidiumbromid zugefügt und gut umgerührt (siehe Tabelle 2.5.).

Das Gel wurde dann in eine Gießkammer gefüllt und die Slotformer eingesteckt. Nach 20 Minuten war das Gel polymerisiert. Aufgetragen wurden pro Slot jeweils 3 µl PCR-Produkt bzw. verdaute DNA, die mit je 3 µl Farbstoff vermischt worden waren. Zum Größenvergleich der DNA-Fragmente wurde immer auch ein VIII-DNA-Molekulargewichtsmarker (Roche) aufgetragen. Die Laufzeit der Elektrophorese variiert zwischen 25 und 40 Minuten und findet unter Verwendung einer 80 mV- Quelle statt.

2.3 Materialien

2.3.1 Geräte

ABI Prism 3100-Avant Genetic Analyzer

Eismaschine AF-100

Elektrophoresekammer Multiphor II

Elektrophorese-Netzgerät PS 9009

Flachbettgelkammer

Fotoanlage Herolab E.A.S.Y.

Horizon 58 Gelelektrophorese-Apparat

Kühlzentrifuge Sigma 3K30

Mikrowelle

Magnetrührer RCT basic

Netzteil Biometra Power Pack P25

Peltier Thermal Cycler PTC-200 MJ Research

Peltier Thermal Cycler PTC-200 MJ Research Gradienten-Cycler

pH-Meter 765 Calimatic

Schüttler GFL 3015

Metallblock-Thermostat DB-2A

Thermocycler UNO-Thermoblock

Thermomixer comfort

Thermostat Multi Temp II

Tischzentrifuge E-Centrifuge

UV-Lampe Biometra TI 1

Waage Kern 510

Wassermaschine Mebra Pure

2.3.2 Chemikalien

10 x NEB-Puffer	New England Biolabs
Acrylamid/Bisacrylamid Rotiphorese Gel 40 (29:1)	Roth
AmpliTaq DNA Polymerase, 5U/ µl	Roche
BigDye® Terminator-Kit v 1.1	Applied Biosystems
Borsäure	Roth
Bromphenolblau	Pierce
Dextranblau	Fluka
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck
Desoxynukleotidsäure (DNA)-Molekulargewichtsmarker, Typ VIII (19-1114bp)	Roche
Desoxynukleotidsäure (DNA)-Primer	BioTeZ
Desoxynukleotidtriphosphate (dNTPs)-Mix, 2mM, pH 8,5	Roth
Essigsäure, 100%	Roth
Ethanol, absolute	Merck
Ethidiumbromid	Roth
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Roth
Formaldehydlösung 37%	Merck
Formamid 99,5%	Merck
GeneAmp PCR Reagent Kit	Roche
Glycerin	Sigma
Glycin	Serva
HI-DI Formamid (reines Formamid)	Applied Biosystems
Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie (HPLC)- Wasser	Roth
Magnesiumchlorid	Roche
<i>Mutation Detection Enhancement</i> (MDE)-Lösung 2x	Cambrex
Natriumcarbonat	Roth
Natriumhydroxid-Plätzchen	Merck
Natriumthiosulfat-Lösung	Merck
Natronlauge, 1 N	Merck
Polyacrylamid (PAA)-Gel	
Restriktionsenzym Aci I	New England Biolabs
Restriktionsenzym Dde I	New England Biolabs
Restriktionsenzym Mwo I	New England Biolabs
Salzsäure	Merck
SeaKem® LE Agarose	Cambrex
Seralpur-Wasser	Membrapur- Aufbereitungsanlage

Silbernitrat

N,N,N,N-Tetramethyldiamin (TEMED)

Tris (Base)

Xylencyanol

Merck

Promega

Roth

Pierce

3. Ergebnisse

Die Entwicklung von sequenzspezifischen Primerpaaren unter den angegebenen Bedingungen (siehe Methoden) verlief für alle zu untersuchenden Exons erfolgreich. Dieser Schritt diente als Grundlage für die nachfolgende Optimierung der Polymerase-Chain-Reaction (PCR).

Im Folgenden werden die Ergebnisse für die Optimierung und Durchführung der Polymerase-Chain-Reaction (PCR) und der Single-Strand-Conformation-Polymorphism (SSCP)-Analyse, sowie der Sequenzierung nach den untersuchten Myomesin-Exons 7, 8, 9, 22, 23, 24, 25 und 26 aufgeschlüsselt dargestellt.

Die optimierte PCR diente der Vervielfältigung der zu untersuchenden DNA und stellte die Basis für die nachfolgenden Schritte dar. Mittels SSCP wurden die DNA-Proben auf durch Konformationsänderungen verursachte Auffälligkeiten in ihrer Laufeigenschaft im Gel untersucht. Um die Wahrscheinlichkeit der Mutationsdetektion und die Sensitivität der Methode zu erhöhen, wurden für jedes Exon zwei unterschiedliche Bedingungen ausgewählt. Zeigte sich eine Auffälligkeit, wurde das Fragment neu amplifiziert und die SSCP wiederholt. Die automatische Sequenzierung diente zur Überprüfung der in der SSCP-Analyse gewonnenen Ergebnisse.

Aus Platzgründen werden zu jedem Exon nur exemplarische Gel-Bilder dargestellt und erläutert.

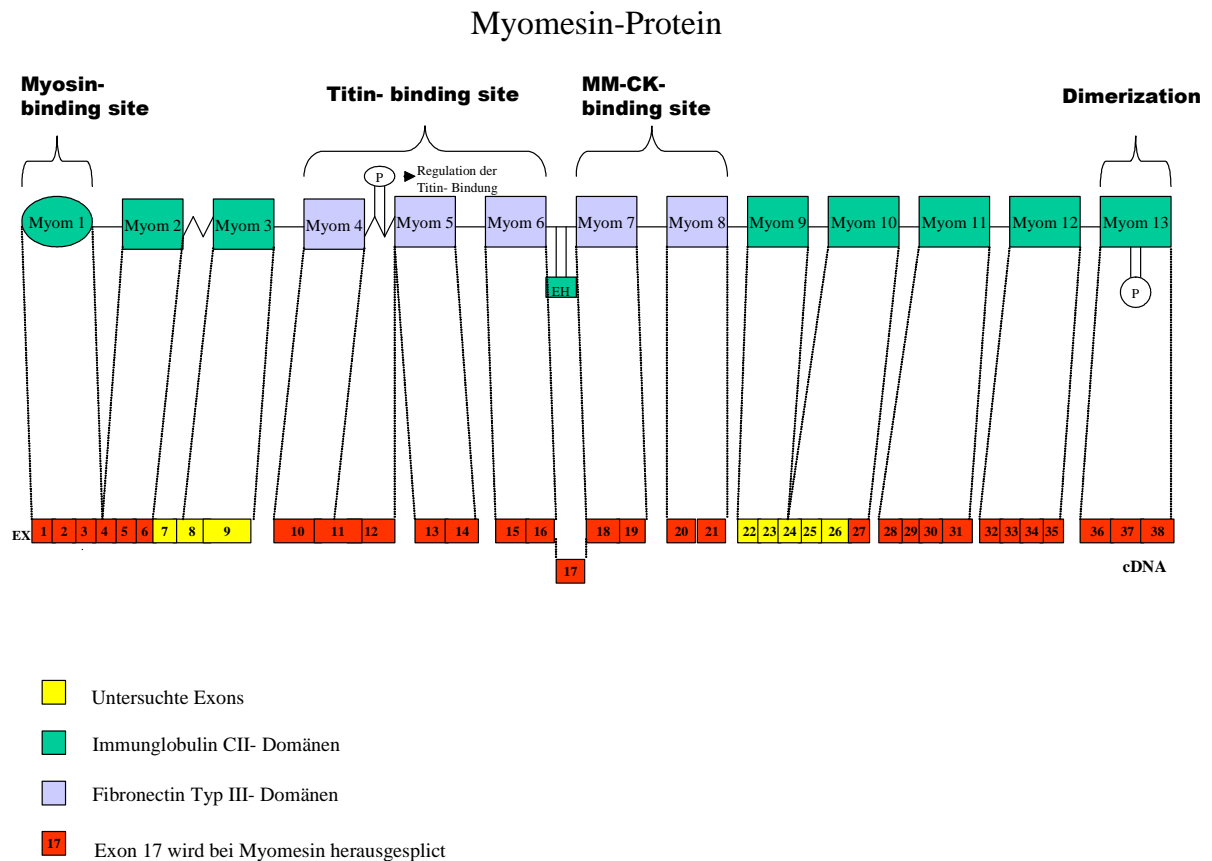


Abbildung 3.1: Darstellung des Myomesin-Proteins und *MYOM*-Gens. Das 185 kDa umfassende Myomesin-Protein ist aus 38 Exons und 37 Introns zusammengesetzt. *MYOM* umfasst ungefähr 105 kb von DNA (Steiner *et al.*, 1999). Gelb: untersuchte Exons des *MYOM*-Gens. Grün: Immunglobulin CII-Domänen. Blau: Fibronectin Typ III-Domänen.

3.1 Exon 7 der Myomesin Gen-Analyse

3.1.1 Polymerase-Chain-Reaction (PCR)

Das für Exon 7 entwickelte Primerpaar konnte erfolgreich optimiert werden. Das gesamte DNA-Fragment hatte eine Größe von 283 bp.

Mit Hilfe des DNA-Molekulargewichtsmarkers konnte gezeigt werden, dass das amplifizierte DNA-Fragment im erwarteten Größenbereich lag.

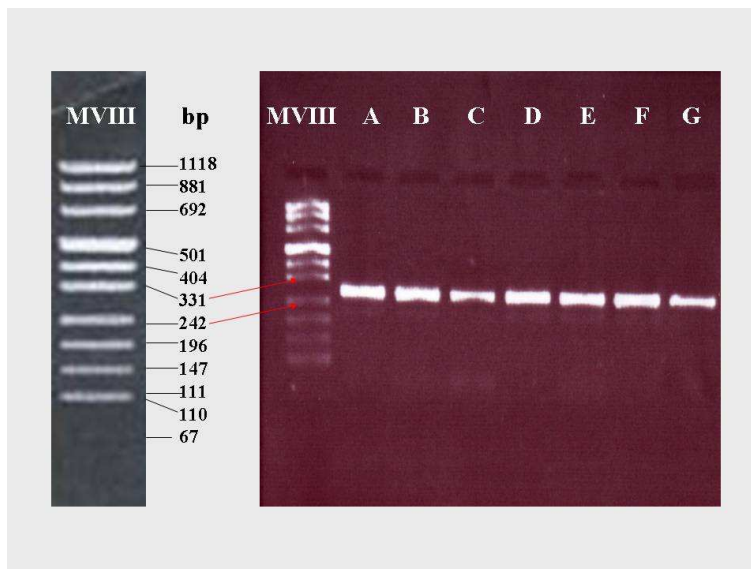


Abbildung 3.2: Optimierung der PCR. Ausschnitt eines 3%igen Agarosegels mit 283 bp PCR-Produkt des Exons 7. A-G: Probanden-DNA; MVIII: Molekulargewichtsmarker.

Es konnten alle DNA-Proben der 410 HCM-Patienten erfolgreich amplifiziert werden.

3.1.2 Single-Strand-Conformation-Polymorphism (SSCP)-Analyse

Nach der Amplifikation der DNA der 410 HCM-Patienten mittels PCR wurde die SSCP-Analyse durchgeführt. Für jedes Exon wurden zwei Gele entsprechend der verschiedenen SSCP-Bedingungen angefertigt.

Die Optimierung der SSCP ergab die folgenden zwei Bedingungen:

- A) 10% Polyacrylamid-Gel bei 20°C mit einer Laufzeit von 70 Minuten.
- B) MDE-Gel bei 15°C mit einer Laufzeit von 50 Minuten.

SSCP-Gele des Exons 7 des Myomesin-Gens

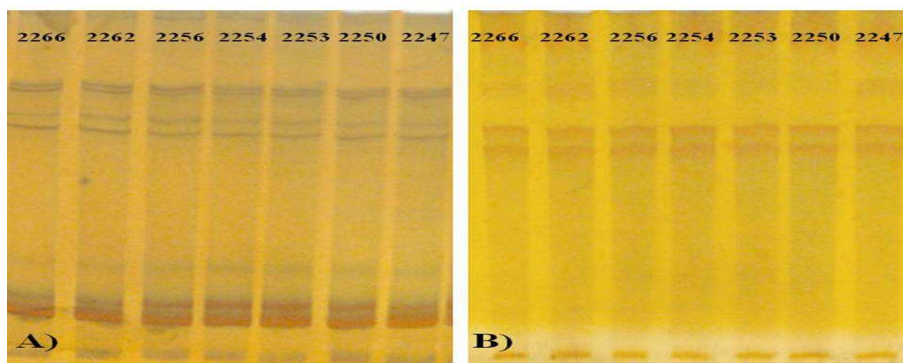


Abbildung 3.3: SSCP-Gele des Exons 7 des Myomesin-Gens. A) 10% Polyacrylamid-Gel bei 20°C mit einer Laufzeit von 70 Minuten. B) MDE- Gel bei 15°C mit einer Laufzeit von 50 Minuten.

Variationen der Nukleotid-Sequenz in einer einzigen Base verursachen Veränderungen des Laufverhaltens der DNA-Proben im SSCP-Gel. Allgemein wurden vier verschiedene Bandenmuster bei der SSCP-Analyse des Exons 7 identifiziert (A bis D). Die unterschiedlichen SSCP-Bandenmuster ließen sich am besten in 10% Polyacrylamid-Gel erkennen.

Aufgrund der Vielfältigkeit der Muster der SSCP-Analyse waren Sequenzunterschiede zu erwarten. Von allen 410 untersuchten DNA-Proben wurden 13 Proben zur Sequenzierung ausgewählt. Die Vielfältigkeit der Bandenmuster aus der SSCP-Analyse ließ sich in der Sequenzierung bestätigen. Dies bedeutet, dass die Vielfältigkeit der Muster durch unterschiedliche Variationen der Sequenz verursacht wurde. Die nächste Abbildung zeigt die SSCP-Analyse der sequenzierten Proben.

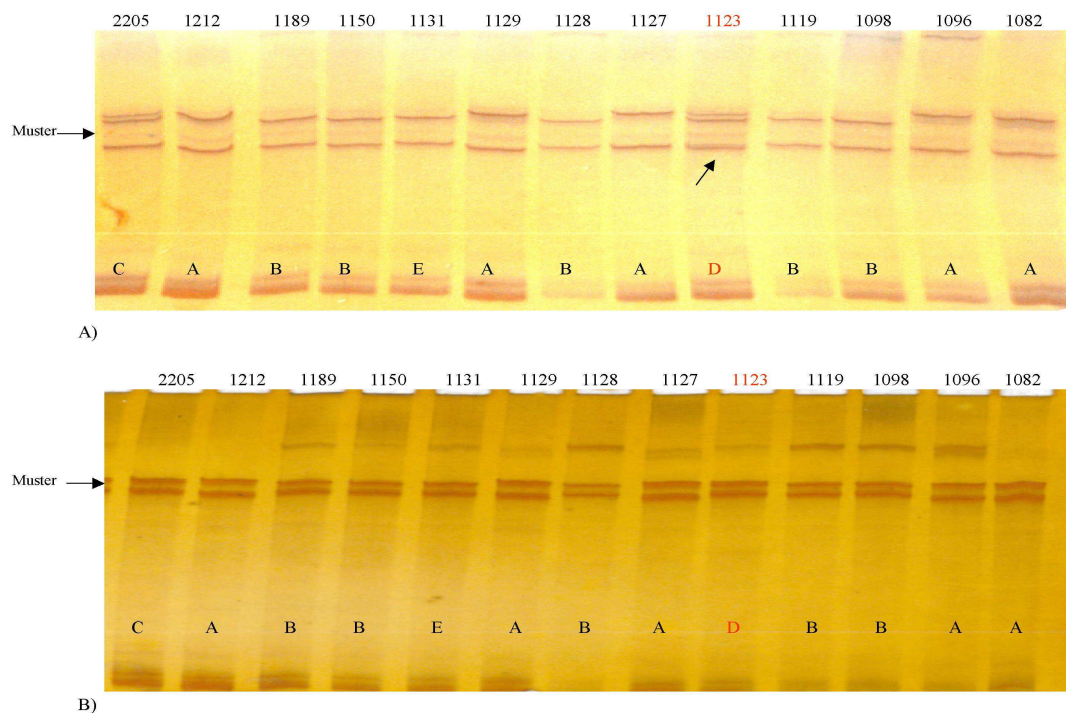


Abbildung 3.4: SSCP-Analyse der sequenzierten Proben des Exons 7 des *MYOM*-Gens. A) 10% Polyacrylamid-Gel bei 20°C mit einer Laufzeit von 70 Minuten. B) MDE-Gel bei 15°C mit einer Laufzeit von 50 Minuten. Die SSCP-Analyse zeigt ein sehr heterogenes Muster für beide SSCP-Bedingungen. Die Nukleotid-Sequenzunterschiede erklären die Vielfältigkeit der SSCP-Bandenmuster bei diesen Proben. Zu beachten ist die Korrelation zwischen SSCP-Muster und Nukleotid-Sequenz, siehe Tabelle 3.1.

Muster A: DNA-Proben 1082, 1096, 1127, 1129, 1212. Muster B: DNA-Proben 1098, 1119, 1128, 1150, 1189. Muster C: DNA-Probe 2205. Muster D: DNA-Probe 1123. Muster E=B: DNA-Probe 1131. Die Nukleotid-Sequenz der DNA Nr. 1131 weist Unterschiede im Vergleich zu allen anderen Proben auf. Das Laufverhalten der DNA Nr. 1131 im SSCP-Gel entspricht trotzdem dem Muster B, siehe Tabelle 3.1.

DNA- Probe 1123: Bei dieser DNA-Probe wurde in dieser Studie die Mutation Leu390Phe erstmals identifiziert (Erläuterung s. Text 3.1.4). Die Auffälligkeit trat zudem nur bei Gel A auf.

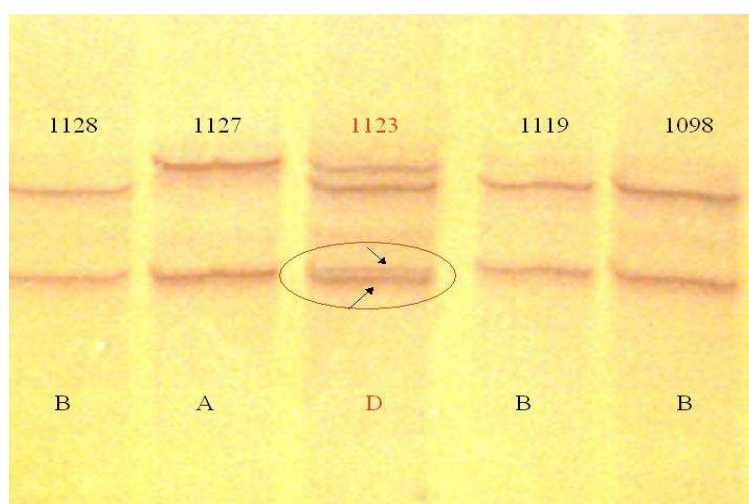


Abbildung 3.5: Detail der zwei unteren Banden der DNA-Probe 1123 (Mutation Leu390Phe). Die Probe bildete statt einer Bande zwei unterschiedliche Banden aus. 10% Polyacrylamid-Gel bei 20°C mit einer Laufzeit von 70 Minuten.

3.1.3 Sequenzierung

Von allen 410 untersuchten DNA-Proben wurden 13 Proben zur Sequenzierung ausgewählt. Für jedes in der SSCP-Analyse gefundene Muster (A bis D) wurde bei der Sequenzierung ein entsprechender Nukleotid-Sequenzunterschied identifiziert. Dies beweist, dass ein einzelner Nukleotid-Austausch in der Sequenz ein besonderes Laufverhalten der DNA-Stränge in der SSCP-Analyse verursachen kann. Die nächste Tabelle zeigt die Varianten oder Polymorphismen (SNPs) und eine Mutation (Leu390Phe), die im Exon 7 gefunden wurden.

	WT	SNP 1	SNP 2	SNP 3	SNP 4	Mut Leu390Phe
	CC	CC	GG	GG	CC	CC
Variante 1	AA	AA	TT	AA	TT	CT
Variante 2				GA		
Position	g.47309	g.47317	g.47355	c.1480;g.47409	c.1502; g.47431	
				Codon 382	Codon 390	
				CAC: His	CTC: Leu	
				CAT: His	TTC: Phe	
Patienten Nr.						
SSCP-Muster A						
1082	CC	GG	GG	CC	CC	CC
1096	CC	GG	GG	CC	CC	CC
1127	CC	GG	GG	CC	CC	CC
1129	CC	GG	GG	CC	CC	CC
1212	CC	GG	GG	CC	CC	CC
SSCP-Muster B						
1098	AA	TT	AA	TT	CC	CC
1119	AA	TT	AA	TT	CC	CC
1128	AA	TT	AA	TT	CC	CC
1150	AA	TT	AA	TT	CC	CC
1189	AA	TT	AA	TT	CC	CC
SSCP-Muster C						
2205	AA	TT	GA	TT	CC	CC
SSCP-Muster D*						
1123	AA	TT	GA	TT	CT	CT
SSCP-Muster E=B						
1131	CC	TT	GA	CC	CC	CC

Tabelle 3.1: Verschiedene Polymorphismen (SNPs) und Mutation in Exon 7 des *MYOM*-Gens. Innerhalb des PCR-Produktes von Exon 7 wurden fünf Stellen identifiziert, an denen SNPs und eine Mutation auftraten. Ursächlich sind die Nukleotid-Sequenzunterschiede, die die vielfältigen Bandenmuster in der SSCP-Analyse verursachen. WT: Wild Typ; His: Histidin; Leu: Leucin; Phe: Phenylalanin; g: genomische DNA; c: kodierende DNA.

Es wurde drei verschiedenen SNPs im intronischen Bereich des Exons 7 identifiziert. Die entsprechenden Positionen waren g.47309, g.47317 und g.47355¹ (siehe Text 3.1.8). Im

¹ Die Nummerierung der Positionen der SNPs sowie der Mutationen wurden nach der Referenzsequenz (NT_010859) durchgeführt. Die Nukleotid-Nummer beginnt mit "g", wenn genomische DNA verwendet wurde oder mit "c", wenn nur die kodierenden DNA-Referenzsequenzen verwendet wurden.

kodierenden Bereich wurde ein SNP (c.1480) sowie eine Mutation in Codon 390 (Leu390Phe) identifiziert (siehe Text 3.1.4).

Polymorphismus (SNP) c.1480 im Exon 7 des MYOM-Gens

Im exonischen Bereich wurde ein häufiger SNP in der Position c.1480 (Codon 382) identifiziert. Die Sequenz-Analyse ergab einen stillen² homozygoten SNP, der die Aminosäure Histidin im Codon 382 betraf. Dabei wurde die Base Cytosin gegen Thymin ausgetauscht. Dieser Basenaustausch verursacht keinen Aminosäureaustausch (His382His).

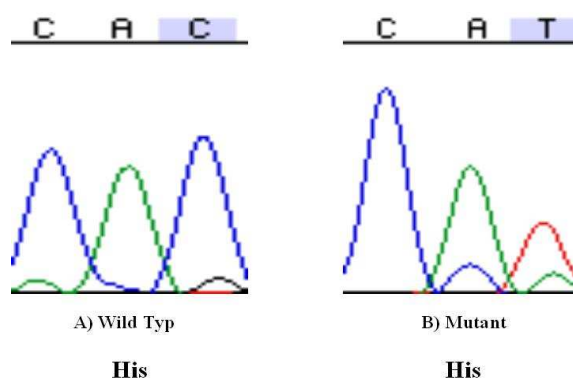


Abbildung 3.6: Chromatogramme des Codons 382 des *MYOM*-Gens. A) Codon 382. Normale Sequenz (DNA-Proben: 1082, 1096, 1127, 1129, 1131, 1212). B) Homozygote Mutation (Cytosin>Thymin) in der dritten Base des Codons 382. (DNA-Proben: 1098, 1119, 1123, 1128, 1150, 1189, 2205). Der Basenaustausch in der dritten Position eines Codons verursacht selten einen Aminosäureaustausch.

3.1.4 Identifikation der Leu390Phe-Mutation bei Familie S

Von allen untersuchten HCM-Patienten wurde die Leu390Phe-Mutation erstmals bei Patient 1123 bzw. Proband IV-III der Familie S (siehe Stammbaum in der Abbildung 3.9) identifiziert.

Die heterozygote Missense-Mutation in Position c.1502 betrifft die Aminosäure Leucin (Leu) im Codon 390. Dabei wurde die erste Base des Codons 390, Cytosin, gegen Thymin ausgetauscht (CTC > TTC). Dieser Basenaustausch verursacht den Aminosäureaustausch Leucin (Leu) gegen Phenylalanin (Phe), welche zwei Aminosäuren mit verschiedenen Eigenschaften sind, da es sich um eine aliphatische und um eine aromatische Aminosäure handelt (siehe Abbildung 3.8.). Die Aminosäuren-Eigenschaften sind für die Ausbildung der Tertiärstruktur der Proteine maßgeblich. Aus diesem Grund bewirkt eine Mutation, die den

² Ein stiller SNP ist ein SNP, bei dem der Nukleotid-Austausch keinen Aminosäuren-Austausch verursacht.

Austausch von zwei Aminosäuren mit verschiedenen Eigenschaften verursacht, wahrscheinlich eine Beeinflussung der Tertiärstruktur eines Proteins und dadurch seine Funktion.

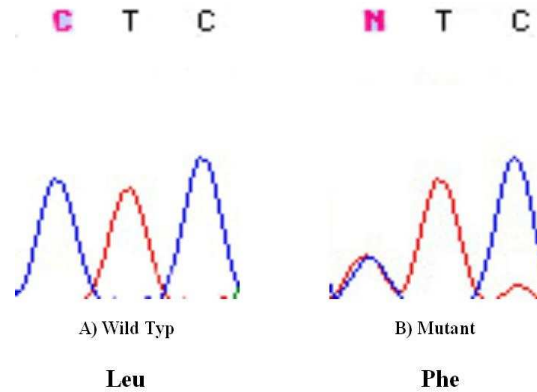


Abbildung 3.7: Chromatogramm des Codons 390 des *MYOM*-Gens. A) Codon 390. Wild Typ. B) Mutation Cytosin>Thymin (Mutation Leu390Phe) in der ersten Base des Codons 390 bei Patienten-Probe 1123 (oder Proband IV-III der Familie S; siehe Stammbaum in Abbildung 3.9). Die Mutation Leu390Phe verursacht einen Aminosäureaustausch. Mutationen und Polymorphismen, die die erste Base eines Codons betreffen, verursachen häufig einen Aminosäureaustausch. Leu, Leucin; Phe, Phenylalanin.

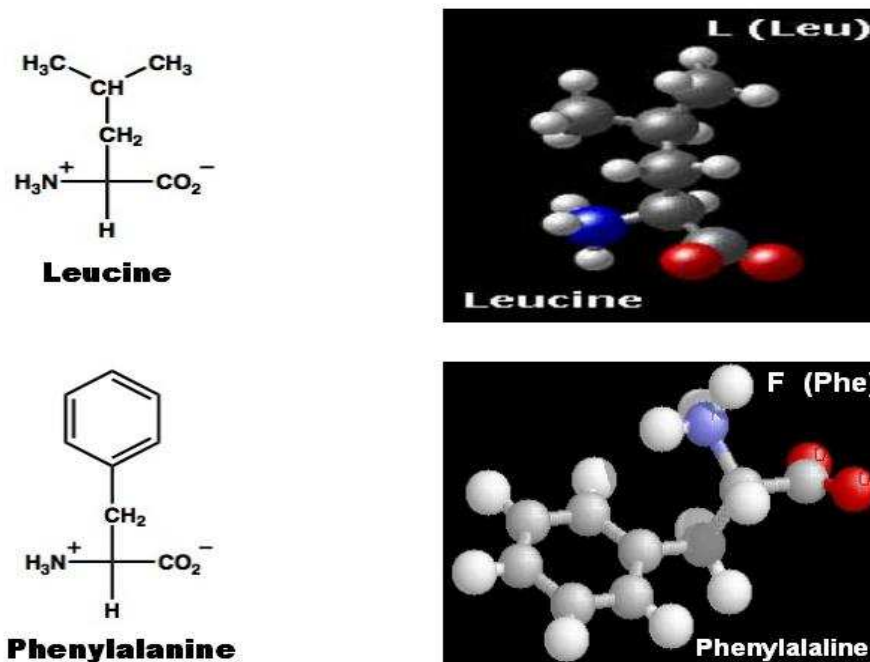


Abbildung 3.8: Darstellung der Aminosäuren Leucin und Phenylalanin. Leucin ist eine aliphatische und schwach hydrophobe Aminosäure. Phenylalanin ist im Gegensatz dazu eine aromatische und viel stärker hydrophobe (wasserunlösliche) Aminosäure.

3.1.5 Lokalisation der Leu390Phe-Mutation in hoch konservierter Region

Die Leu390Phe-Mutation wurde innerhalb einer hoch konservierten Region des Proteins Myomesin identifiziert. Dies wird von der Tatsache verdeutlicht, dass die Aminosäure Leucin an dieser Stelle Bestandteil vieler von bei Säuge- und nicht Säugetieren vorkommender Proteine ist (siehe Tabelle 3.2). Nur bei *Bos taurus* (*Wildrind*) tritt die Aminosäure Prolin (Pro) statt Leucin (Leu) im Codon 390 der Myomesin-Konsens-Sequenz auf. Da die Aminosäure Leucin im Verlauf der Evolution stark konserviert wurde, bedeutet dies, dass diese Region wichtig für die Funktion des Proteins ist und dass ein Aminosäureaustausch Veränderungen der Tertiärstruktur der Proteine nach sich ziehen kann.

	371		390		396																						
<i>Homo sapiens</i>	R	Y	K	G	E	F	D	E	T	R	F	H	A	G	A	S	T	M	P	L	S	F	G	V	T	P	
<i>Mus musculus</i>	R	Y	K	G	E	L	D	E	S	L	L	R	G	G	V	S		M	P	L	S	F	A	V	T	P	
<i>Gallus gallus</i>	R	Y	K	G	E	L	D	D	S	L	L	R	G	G	V	S		M	P	L	S	F	A	V	T	P	
<i>Bos indicus</i>	R	Y	K	G	E	L	D	A	S	Y	L	H	A	G	T	F	S	M	P	L	S	L	G	V	T	P	
<i>Bos taurus</i>	R	Y	K	G	E	I	D	D	T	R	F	H	S	G	A	S	T	L	P	P	S	X					

Tabelle 3.2: Anordnung der Aminosäuren 371 bis 396 von Myomesin für verschiedene Spezies.

Das Exon (Exon 7), auf dem sich die Mutation Leu390Phe befindet, kodiert Teile der zweiten *MYOM*-Domäne (*MYOM 2*), einer Immunoglobulin-like Domäne, die wichtig für den exakten Einbau von *MYOM* in die M-Bande während der Myofibrillogenese ist. Die Affinität der N-terminalen Domäne 1 (*MYOM 1*), sich an Myosin zu binden und den Einbau in die M-Bande zu gewährleisten, ist "in vivo" nicht ausreichend. Die zweite Domäne des Myomesin-Proteins wird für diesen Einbau benötigt (Auerbach *et al.*, 1999).

Der Proband mit der Leu390Phe-Mutation zeigte keine weiteren Mutationen in den bekannten Krankheitsgenen. Die SSCP-Analysen der kodierenden Gene für die β -myosin heavy chain (β -MHC), myosin binding protein C (MyBPC), cardiac troponin T (TnT), cardiac troponin I (TnI), essential und regulatory light chains (ELC und RLC), muscle LIM protein (MLP) und α -actin (ACTC) zeigten keine Auffälligkeiten.

3.1.6 Mutation Leu390Phe: Klinische Befunde bei Familie S

Die Mutation Leu390Phe wurde bei einem Probanden mit türkischem Migrationshintergrund festgestellt. Die Erstdiagnose der Hypertrophen Kardiomyopathie wurde bei Proband 1123 (IV-III; siehe Stammbaum in der Abbildung 3.9) im Alter von 20 Jahren nach einer Synkope nach körperlicher Belastung gestellt. Die Symptome waren seinerzeit charakterisiert durch thorakale Schmerzen, retrosternales Druckgefühl bei körperlicher Belastung und rezidivierende Dyspnoe. Der Patient hatte keine arterielle Hypertonie und wies eine positive

Familienanamnese bei erkranktem Vater und Onkel auf. Der Patient wurde sieben mal stationär wegen Vorhofflimmern behandelt. Der Proband IV-III wies eine moderate septale Hypertrophie und mitralen Reflux auf, eine obstruktive Ausflussstörung lag jedoch nicht vor. EKG: Sinusrhythmus, Frequenz 70/min, Linkstyp, positiver Sokolow-Lyon-Index (R (V5) 2,1 mV + S (V1) 3 mV = 5,1 mV), negative T-Wellen über der gesamten Vorderwand sowie in I und aVL sowie positives T in aVR. Die Blutbildwerte waren unauffällig, ebenso die Werte für TSH, T3 und T4. Der Röntgen-Thorax wies ein großes Herz auf ohne Zeichen für pulmonale Stauung, Infiltrate oder Rundherde. Kein Pleuraerguss. Bei der Echokardiographie wurde eine nicht obstruktive Kardiomyopathie bestätigt (septale und apikale Hypertrophie mit einer Septumdicke von 15mm). Die körperliche Untersuchung ergab keine pathologischen Befunde bei einem Blutdruck von 125/70 mmHg.

Die letzte Untersuchung im August 2005 zeigte im Vergleich mit einer Untersuchung im Jahr 1992 eine Verdickung des Interventrikularseptums (Septumdicke von 21mm), Trikuspidal-Insuffizienz und eine auffällige Myokardtextur.

Die Evolution der HCM bei Proband IV-III wird in der nächsten Tabelle (Tabelle 3.3) zusammengefasst:

	IVS (mm)	LVEDD (mm)	LVESD (mm)	Ao. Asc. (mm)	LA (mm)	Mitralis Reflux
1992	15	50	19	30	44	Ja
2005	21	44	27	24	48	Ja
	Leitungsblock	Neg T	path.Q-Zacken	S-L Index (mV)	NYHA	
1992	Nein	Ja (V2-6; I, aVL)	Nein	5,1	II	
2005	Nein	Ja (V2-6; I,II,aVL,aVF)	Nein	4,2	II	
	Blutdruck	Herzfrequenz	Kreatinin	CRP	Myoglobin	CK(37°C)
1992	125/70	70/m	-	-	-	-
2005	145/90	72/m	1,25mg/dl	4,58mg/dl	77µg/l	203U/l
	Trik. Insuff.	Klinische Status				
1992	Nein	Betroffen				
2005	Ja	Betroffen				

Tabelle 3.3: Klinische Befunde des Probanden IV-III. IVS: Interventrikularseptum; LVEDD: Linksventrikulärer enddiastolischer Durchmesser; LVESD: Linksventrikulärer endsystolischer Durchmesser; Ao.asc: Aorta ascendens; LA: linker Vorhof (Atrium); Trik. Insuff.: Trikuspidalis Insuffizienz; Neg T: negative T-Wellen; path. Q-Zacken: pathologische Q-Zacken; S-L Index: Sokolow-Lyon-Index; NYHA: New York Heart Association-Klassifikation; CRP: C-reaktives Protein; CK: Creatinkinase.

Der Bruder des Probanden IV-III (IV-V, siehe Abbildung 3.9) weist ebenfalls die Mutation Leu390Phe auf. Die Krankheit wurde erst in der laufenden Studie aufgrund eines pathologischen EKGs und einer echokardiographisch festgestellten Verdickung des IVS (14 mm) diagnostiziert. Abgesehen von rascher Ermüdung bei körperlicher Belastung wies der Proband bis dato keine klinischen Symptome auf.

Der klinische Befund des Probanden IV-V wird in der nächsten Tabelle (Tabelle 3.4) zusammengefasst:

Herzfrequenz	60/m		
systolischer BD	130 mmHg		
diastolischer BD	80 mmHg		
EKG		IVS	14 mm
Rhythmus	Sinus	Pressure gradient in LV outflow tract	3,2 mmHg
LVH	Pos	Mitral Reflux	Nein
Sokolow.Lyon Index	28 mV	RVAW	5 mm
Negative T-Wellen	V4-V6	RVEDD	25 mm
path. Q-Zacken	Nein	Laborparameter	
Echokardiographie		Kalium (Plasma)	4,3 mmol/l
Aorta ascendens	28 mm	Natrium	139 mmol/l
LA	37 mm	Creatinine	1,01 mg/dl
LVEDD	44 mm	Creatine kinase	200 IU/l
LVEDS	29 mm	CKMB Fraktion	14 IU/l
LVEDV (Simpson)	71 mm		
LVESV (Simpson)	21 mm		
EF (by Simpson)	70.50%		
FS	34%		

Tabelle 3.4: Klinische Befunde des Probanden IV-V. Die klinische Untersuchung sowie der Versand der Blutproben des Probanden IV-V zur Mutationsdetektion erfolgten freundlicherweise durch Frau Dr. Ana Laynez Carnicero vom Universitätskrankenhaus Valencia (Spanien).

BD: Blutdruck; EKG: Elektrokardiogramm; LVH: Linksventrikuläre Hypertrophie; path. Q-Zacken: pathologische Q-Zacken; LA: linker Vorhof (Atrium); LVEDD: Linksventrikulärer enddiastolischer Durchmesser; LVEDS: Linksventrikulärer endsystolischer Durchmesser; LVEDV: Linksventrikuläres enddiastolisches Volumen; LVESV: Linksventrikuläres endsystolisches Volumen; EF: Ejektionsfraktion; FS: fractional shortening; IVS: Interventrikularseptum; RVAW: Rechtsventrikuläre Vorderwand (anterior wall); RVEDD: Rechtsventrikulärer enddiastolischer Durchmesser.

Die Schwester des Patienten IV-III (IV-II) weist momentan keine HCM-Symptome auf. Das EKG und die echokardiographischen Befunde zeigen keine Auffälligkeiten. Bei dieser Probandin konnte die Existenz der Mutation Leu390Phe ebenfalls nachgewiesen werden.

Der Vater des Patienten IV-III (III-I) leidet an HCM und berichtet über die typischen Krankheitsbeschwerden wie thorakale Schmerzen, retrosternales Druckgefühl bei körperlicher Belastung und rezidivierende Dyspnoe. Der Proband III-I ist momentan nach einem Hirninfarkt bettlägerig. Das EKG dieses Probanden zeigt Zeichen für eine starke

Linksherzhypertrophie mit positivem Sokolow-Lyon-Index. Das EKG zeigt außerdem pathologische Q-Zacken.

Die Mutter des Patienten IV-III (III-II) zeigt keine HCM-Symptome. Das EKG und die echokardiographischen Befunde zeigen keine Auffälligkeiten. In der DNA-Sequenz-Analyse ließ sich die Leu390Phe-Mutation bei dieser Probandin nicht nachweisen.

Ein Cousin des Probanden IV-III (IV-I) ist im Alter von 50 Jahren an plötzlichem Herztod gestorben. Der plötzliche Herztod war bei diesem Probanden die Erstmanifestation einer Herzkrankheit. Es traten vorher nie Symptome bei ihm auf, demzufolge wurde im Vorfeld nie eine Herzkrankheit diagnostiziert. Leider verzichteten die Angehörigen auf eine Autopsie, so dass das Vorliegen einer HCM nie bewiesen wurde.

Eine Tochter des Probanden IV-III (V-I) ist bisher asymptomatisch. Die Farbdoppler-Echokardiographie zeigt normal große Herzhöhlen, eine global gute linksventrikuläre Pumpfunktion ohne Nachweis regionaler Wandbewegungsstörungen, keine LV-Hypertrophie und einen sonographisch und dopplersonographisch unauffälligen Klappenapparat. Keine Rechtsherzbelastungszeichen. Kein Perikarderguss. In der DNA-Sequenz-Analyse ließ sich die Leu390Phe-Mutation bei dieser Probandin nicht nachweisen.

Eine zweite Tochter des Probanden IV-III (V-II) ist bisher ebenfalls asymptomatisch. Das EKG zeigte eine Sinustachykardie mit Frequenzmaximum von 148/min, rasche Frequenznormalisierung in der Ruhepause nach Belastung, keine ektope Reizbildung, keine ST-Streckenveränderungen während und nach Belastung. Die Farbdoppler-Echokardiographie zeigte keine Auffälligkeiten außer geringer Regurgitation aus dem Pulmonalarterienstamm in den rechten Ventrikel im Sinne einer Pulmonalklappeninsuffizienz Grad I. Bei dieser Probandin wurde ein osteochondritischer Zwergwuchs diagnostiziert. In der DNA-Sequenz-Analyse ließ sich die Leu390Phe-Mutation bei dieser Patientin nicht nachweisen.

Ein Sohn des Probanden IV-III (V-III) berichtet über subjektiv verspürtes Herzstolpern, das kein objektives Korrelat im Sinne einer Herzrhythmusstörung darstellt. Das EKG zeigte einen bemerkenswerten Linkstyp bei normfrequentem Sinusrhythmus mit Sinusarrhythmie, Frequenz um 81/min., unauffällige Zeitmaße, rechtsventrikuläre Leitungsverzögerung ohne Anhalt für ventrikuläre Belastung oder Hypertrophie, keine signifikanten Repolarisationsstörungen. Das EKG nach Belastung zeigte eine Sinustachykardie mit Frequenzmaximum von 173/min. RR-Anstieg von 120/70 auf 140/80. Keine ektope Reizbildung, keine ST-Streckenveränderungen. In der ausführlichen echokardiographischen Untersuchung ergaben sich keine Hinweise auf strukturelle Veränderungen am Herzen. Die Öffnungs- und Schließmuster aller Klappen waren regelrecht. Die Größe der Vorhöfe und

Herzkammern war unauffällig. Die Scheidewände waren intakt. Die myokardiale Pumpfunktion der Ventrikel war unauffällig. Die dopplersonographische Erfassung der intra- und extrakardialen Strömungsverhältnisse schloss eine Funktionsstörung aus. Bei noch geringem Lebensalter (Geburtsjahr 1992, bei der Untersuchung 13-jährig) sind bei diesem Probanden regelmäßige kardiologische Kontrollen zwingend indiziert. Die DNA-Sequenz-Analyse bestätigt bei diesem Probanden die Existenz der Leu390Phe-Mutation.

Die Untersuchungen der Probanden V-I, V-II und V-III erfolgte freundlicherweise durch Herrn Dr. Ludwig, Gemeinschaftspraxis Eberbach.

Ein zweiter Sohn des Probanden IV-III (V-IV) ist bisher ebenfalls asymptomatisch. Das EKG zeigte keine Auffälligkeiten bei Sinusrhythmus, Indifferenz-/Steiltyp, Frequenz um 67/min und unauffälliger Erregungsleitung. Die durchgeführte echokardiographische Untersuchung zeigte normal dimensionierte Herzbinnenräume, normale altersentsprechende Wanddicken und normale systolische und diastolische LV-Funktion. Die DNA-Sequenz-Analyse schließt die Existenz der Leu390Phe-Mutation aus.

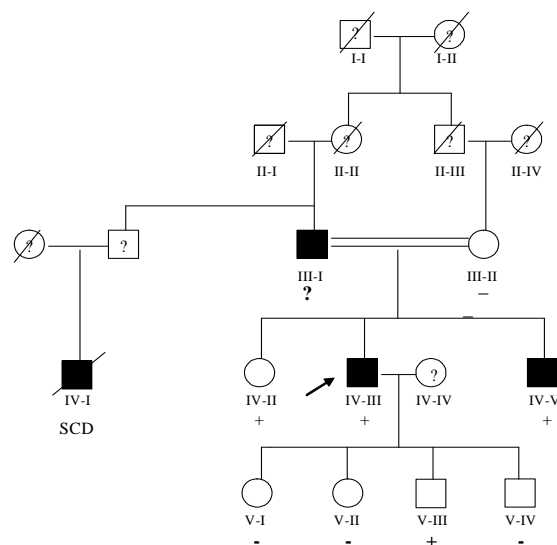


Abbildung 3.9: Stammbaum der türkischen Familie S. Quadrate zeigen Männer; Kreise zeigen Frauen; weiß: unbetroffene Probanden; schwarz: betroffene Probanden; Pluszeichen: Vorliegen der Leu390Phe-Mutation im *MYOM*-Gen; Minuszeichen: Abwesenheit der Leu390Phe-Mutation im *MYOM*-Gen. Der Pfeil zeigt den Index-Patienten; SCD=PHT: sudden cardiac death oder plötzlicher Herztod. Geburtsjahr der Probanden: III-I (1943); III-II (1937); IV-I (1951); IV-II (1966); IV-III (1961); IV-V (1972); V-I (1987); V-II (1989); V-III (1992); V-IV (1998).

3.1.7 Mutation Leu390Phe: Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus (RFLP), Restriktionsenzymverdau.

Mutationen lassen sich mit Hilfe von Restriktionsenzymen bestätigen. Die Restriktionsendonukleasen erkennen und schneiden eine bestimmte Nukleotid-Sequenz. Wenn eine Mutation vorliegt, wird die Sequenz vom Restriktionsenzym nicht erkannt und dadurch anders oder gar nicht geschnitten. Die Mutation Leu390Phe wurde mit Restriktionsenzym DdeI bestätigt. Der Basenaustausch Cytosin gegen Thymin im Codon 390 des *MYOM*-Gens verursachte den Verlust von einer der zwei normalen DdeI-Schnittstellen im Exon 7. Bei 307 durchgeführten Kontrollen unauffälliger Probanden ließ sich die Mutation Leu390Phe nicht nachweisen.

DdeI schneidet bei folgender Sequenz:

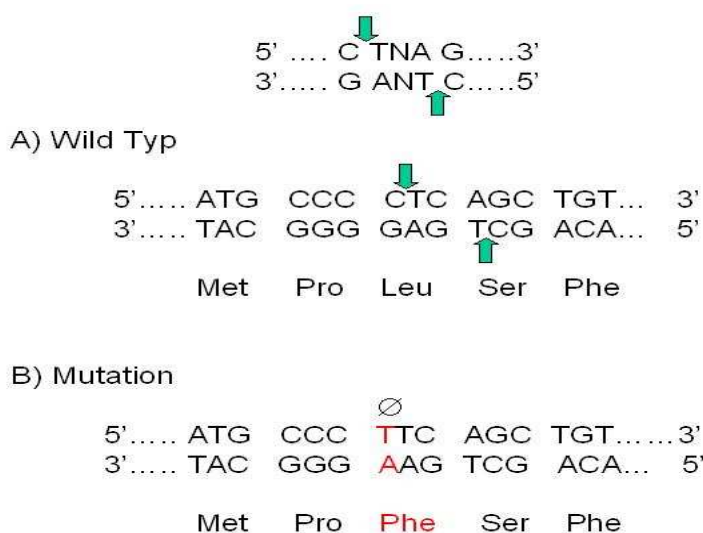


Abbildung 3.10: Darstellung der Schnittstellen des Restriktionsenzym DdeI. A) Normale Nukleotid-Sequenz des Codons 388-392 des *MYOM*-Gens. B) Mutante Sequenz gefunden bei Patienten-Probe 1123 (IV-III). Die Mutation verursacht den Verlust der Schnittstelle von DdeI in Position c.1502 (Position 161 des PCR-Produktes des Exons 7). N: beliebige Base. Ø: Keine Schnittstelle.

Bei normaler DNA-Sequenz hat DdeI zwei Schnittstellen an zwei verschiedenen Positionen des Exons 7. Die zwei Schnittstellen sind 28 bp voneinander entfernt. Nach Enzymverdau von nicht mutanten Sequenzen sind drei DNA-Fragmente zu erwarten. Die DNA-Fragmente haben eine Größe von jeweils 179, 76 und 28 bp.

Im Gegensatz dazu verursacht der Enzymverdau der mutanten Sequenz (siehe mutante Sequenz in der Abbildung 3.10. B)) zwei DNA-Fragmente mit einer Größe von jeweils 207 und 76 bp. Dies geschieht, weil die Mutation den Verlust der Schnittstelle von DdeI in Position c.1502 bewirkt.

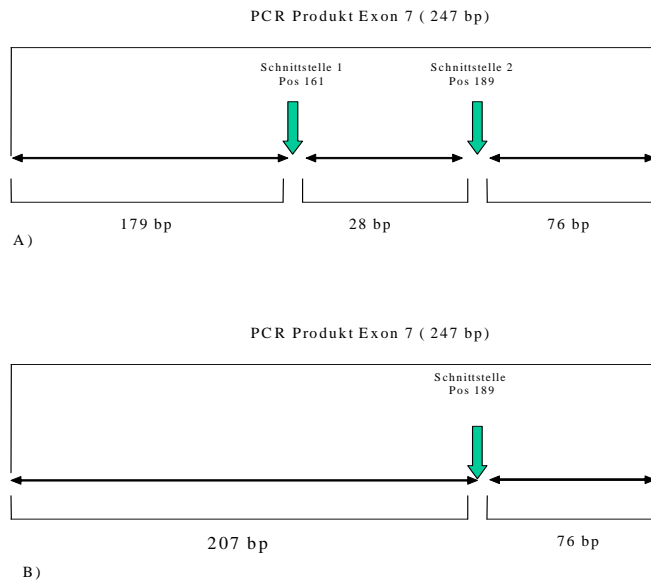
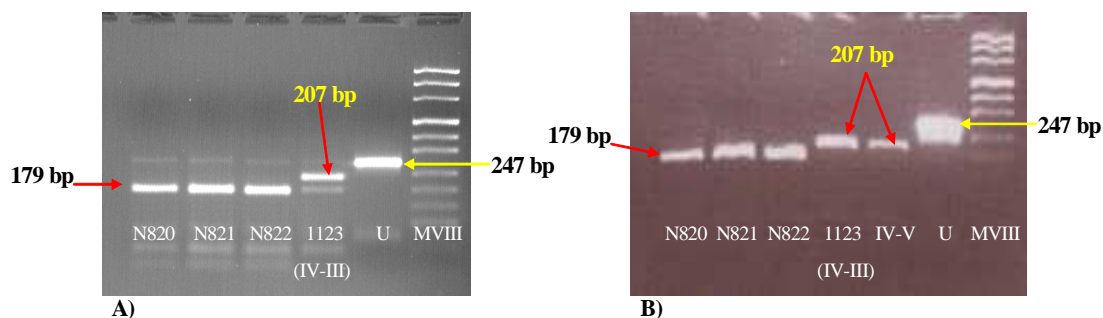


Abbildung 3.11: Darstellung der Schnittstellen des Restriktionsenzym DdeI im Exon 7 des *MYOM*-Gens. A) Wild Typ. Bei normaler DNA-Sequenz hat DdeI zwei Schnittstellen an zwei verschiedenen Positionen des Exons 7 des *MYOM*-Gens. B) Die Mutation Leu390Phe im *MYOM*-Gen verursacht den Verlust der Schnittstelle des Restriktionsenzym DdeI in Position c.1502 (Position 161 des Exon 7-PCR-Produktes).

Es wurden die auffällige DNA-Probe 1123 (IV-III) und eine Zahl von 307 Kontrollen mit DdeI untersucht. Die Untersuchung mit Restriktionsenzym DdeI hat die Ergebnisse der Sequenzierung bestätigt. Bei den 307 Kontrollen ließ sich die Mutation nicht nachweisen. Weitere Untersuchungen haben die Existenz der Leu390Phe-Mutation bei Proband IV-V (Bruder von IV-III, siehe Abbildung 3.9) bewiesen, welcher ein pathologisches EKG mit negativen T-Wellen in V4-V6 und eine moderate Linkshypertrophie aufweist. Bei den Probanden IV-II und V-III konnte die Mutation ebenfalls nachgewiesen werden.

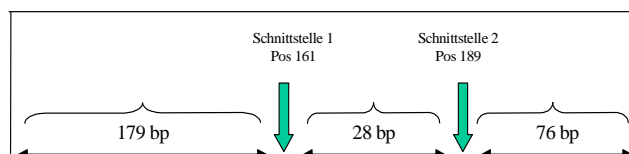
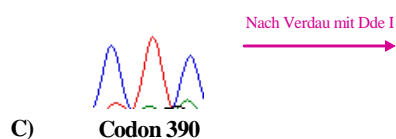
Die nächste Abbildung zeigt den Restriktionsenzymverdau mit DdeI in zwei Ausschnitten eines 3%igen Agarosegels. Die PCR-Produkte N820, N821, N822, 1123 (IV-III) und IV-V wurden mit Restriktionsenzym DdeI verdaut. Das PCR-Produkt U ist ein unverdautes PCR-Produkt, das als Kontrolle benutzt wurde.

Verdau mit Dde I



DNA-Proben: N820,N821,N822

C T C



DNA-Proben: 1123(IV-III) und IV-V

T T C

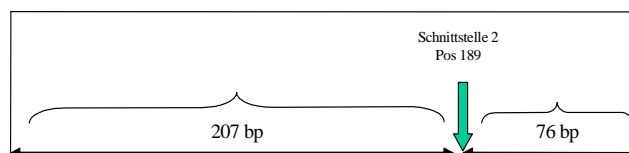
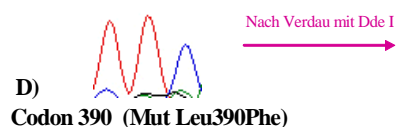


Abbildung 3.12: Darstellung des Verdau von Exon 7 des *MYOM*-Gens mit Restriktionsenzym DdeI. A) und B): unterschiedliche Restriktionsenzymverdaue mit DdeI zur Bestätigung der Existenz der Mutation Leu390Phe bei Patienten 1123 (IV-III) und IV-V.

MVIII: Molekulargewichtsmarker; U: Unverdautes PCR-Produkt (247 bp); 1123 (IV-III) und IV-V: Mutanten-(Leu390Phe) DNA-Proben; N820, N821 und N822: DNA-Kontrolle.

C) Darstellung der Fragmentgröße nach Enzymverdau mit DdeI bei nicht mutanten Sequenzen des *MYOM*-Gens.

D) Darstellung der Fragmentgröße nach Enzymverdau mit DdeI bei Mutation Leu390Phe im *MYOM*-Gen.

3.1.8 Introniche Polymorphismen im Intron 6 des *MYOM*-Gens

Es wurden drei verschiedene Polymorphismen (SNPs) in Intron 6 identifiziert. Die entsprechenden Positionen waren g.47309, g.47317 und g.47355 (siehe Tabelle 3.1.).

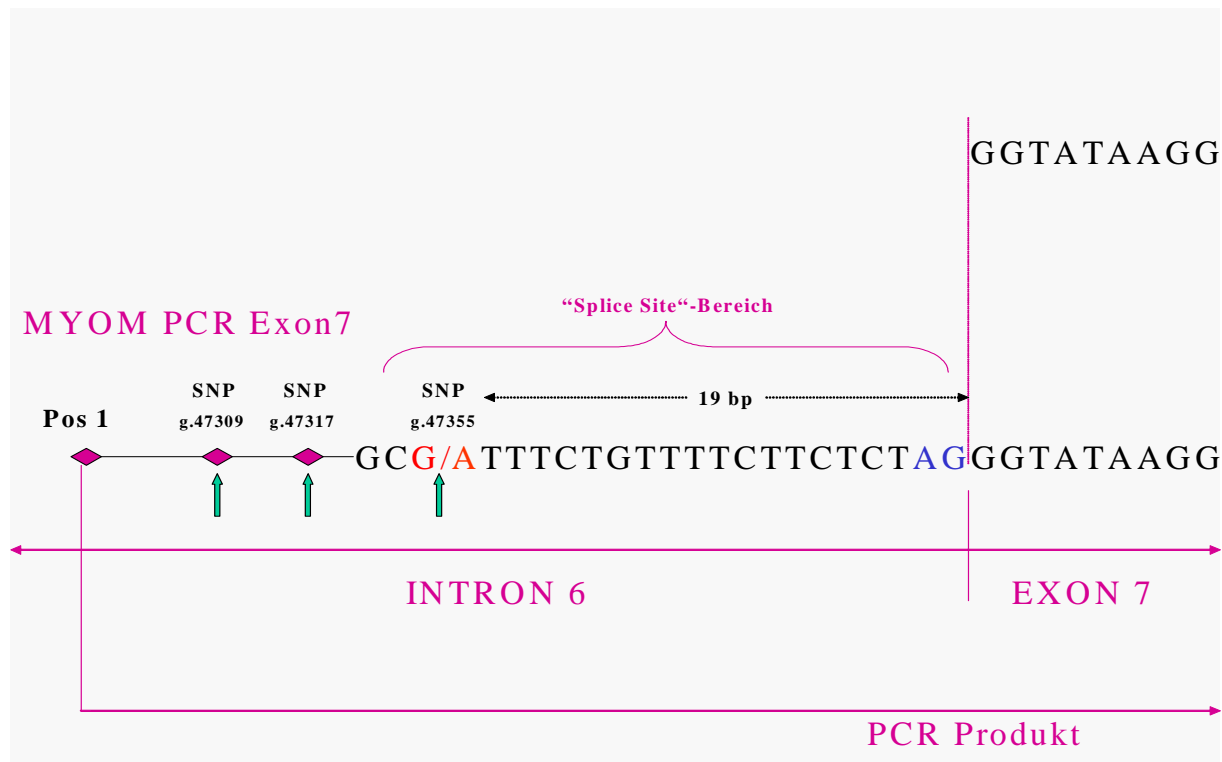


Abbildung 3.13: Darstellung der gefundenen intronischen SNPs in Intron 6 des *MYOM*-Gens. Die Nummerierung der Positionen der SNPs wurde nach der genomischen DNA-Referenzsequenz durchgeführt.

Der SNP in Position g.47355 befindet sich 19 Basen vom Anfang des Exons 7 des *MYOM*-Gens entfernt. Die Sequenz-Analyse ergab einen SNP mit verschiedenen Varianten: Wild Typ g.47355, Homozygote (G-G); SNP g.47355(1), homozygote Variante (A-A) und SNP g.47355(2), heterozygote Variante (G-A).

Bei SNP g.47355(1) ergibt sich der Basenaustausch Guanin gegen Adenin in beiden Allelen. Bei SNP g.47355(2) ergibt sich der Basenaustausch Guanin gegen Adenin in nur einem der beiden Allele.

Gemäß des angegebenen Beispiels für die Grundstruktur der "Splice Site" (siehe Diskussion, Abbildung 4.2.) könnte sich der SNP g.47355 innerhalb des "Splice Site"- Bereichs befinden, da er nur 19 bp vom Anfang des Exons 7 entfernt liegt. Träfe dies zu, könnte dies eine anormale Funktion des "Alternative Splicing" verursachen und somit einen Faktor für das Auftreten einer genetischen Krankheit darstellen (Cáceres und Kornblihtt, 2002; Cartegni *et al.*, 2002; Matlin *et al.*, 2005).

Die anderen beiden SNPs (SNP g.47309 und SNP g.47317), die im Intron 6 identifiziert wurden, haben höchstwahrscheinlich keinen Einfluss auf das “Alternative Splicing“, da sie weit vom Anfang des Exons 7 entfernt liegen.

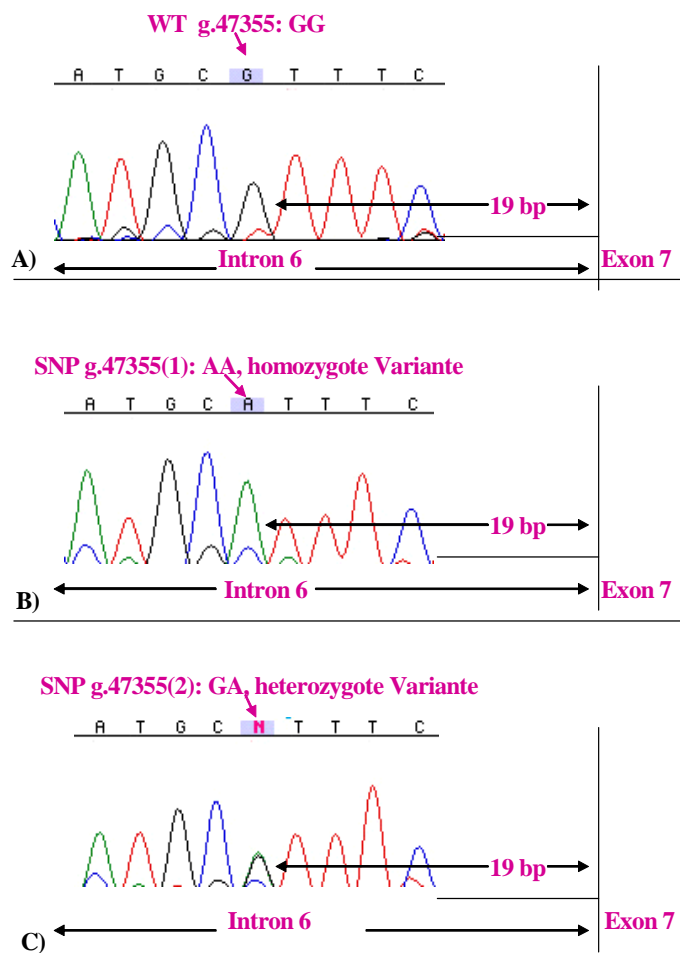


Abbildung 3.14: Darstellung des SNP g.47355 im *MYOM*-Gen. Die Chromatogramme zeigen die drei identifizierten verschiedenen Varianten in Position g.47355. A) entspricht der Wild Typ-Variante in Position g.47355. B) entspricht dem homozygoten SNP g.47355(1). C) entspricht dem heterozygoten SNP g.47355(2).

3.2 Exon 8 der Myomesin Gen-Analyse

3.2.1 Polymerase-Chain-Reaction (PCR)

Das für Exon 8 entwickelte Primerpaar konnte erfolgreich optimiert werden. Das gesamte DNA- Fragment hatte eine Größe von 391 bp.

Mit Hilfe des DNA-Molekulargewichtsmarkers konnte gezeigt werden, dass das amplifizierte DNA-Fragment im erwarteten Größenbereich lag.

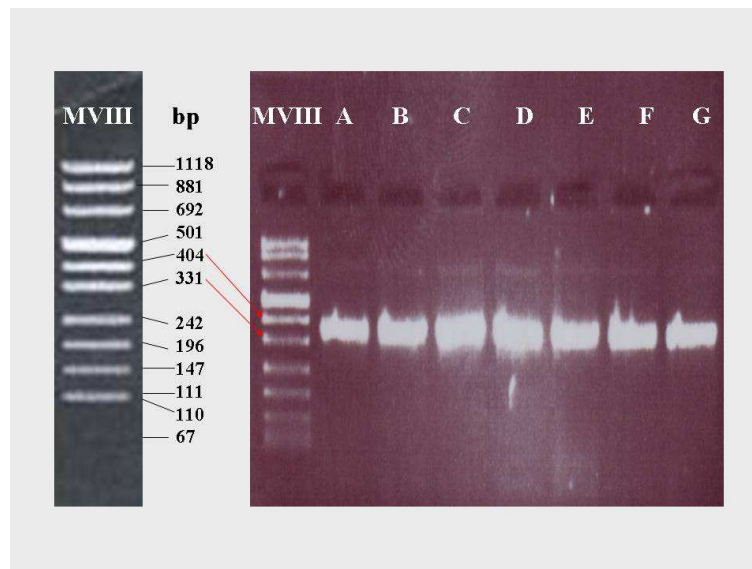


Abbildung 3.15: Optimierung der PCR. Ausschnitt eines 3%igen Agarosegels mit 391-bp PCR-Produkt des Exons 8. A-G: Probanden-DNA; MVIII: Molekulargewichtsmarker.

Es konnten alle DNA-Proben der 410 HCM-Patienten erfolgreich amplifiziert werden.

3.2.2 Single-Strand-Conformation-Polymorphism (SSCP)-Analyse

Nach der Amplifikation der DNA der 410 HCM Patienten mittels PCR wurde die SSCP-Analyse durchgeführt. Für jedes Exon wurden zwei Gele entsprechend der verschiedenen SSCP-Bedingungen angefertigt.

Die Optimierung der SSCP ergab die folgenden zwei Bedingungen:

- A) 10% Polyacrylamid- Gel bei 10°C mit einer Laufzeit von 70 Minuten.
- B) 10% Formamid- Gel bei 5°C mit einer Laufzeit von 60 Minuten

SSCP-Gele des Exons 8 des Myomesin-Gens

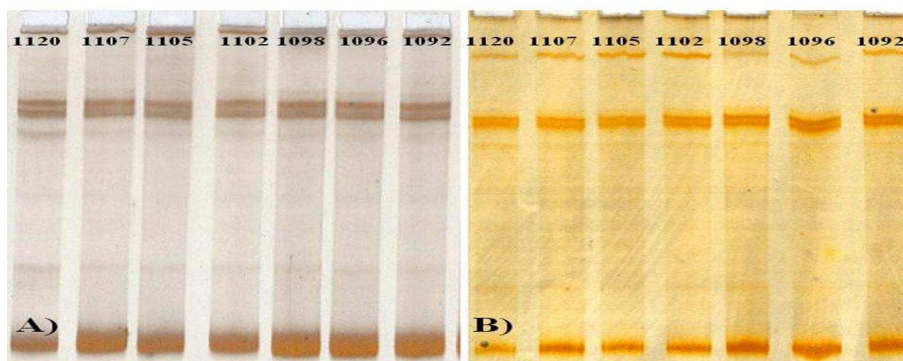


Abbildung 3.16: SSCP-Analyse des Exons 8 des Myomesin-Gens. A) 10% Polyacrylamid-Gel bei 10°C mit einer Laufzeit von 70 Minuten. B) 10% Formamid-Gel bei 5°C mit einer Laufzeit von 60 Minuten.

Die SSCP-Analyse des Exons 8 zeigte ein sehr homogenes SSCP-Bandenmuster. Keine der 410 untersuchten DNA-Proben zeigte eine Auffälligkeit. Es wurden dennoch 5 Proben (DNA-Nr. 1815, 1823, 1824, 1826, 1827) als Kontrolle für die Sequenzierung ausgewählt.

3.2.3 Sequenzierung

Fünf ausgewählte DNA-Proben wurden sequenziert. Keine der ausgewählten Proben zeigte Auffälligkeiten in der SSCP-Analyse. Die Sequenz-Analyse hatte die Ergebnisse der SSCP-Analyse bestätigt, da kein Nukleotid-Sequenzunterschied auftrat. Die sequenzierten Proben des Exons 8 hatten die gleiche Sequenz wie die Referenzsequenz (GenBank Nummer NT_010859). Aus Platzgründen wird die Sequenz des Exons 8 nicht gezeigt.

SSCP des Exons 8 des Myomesin Gens: Sequenzierte Proben

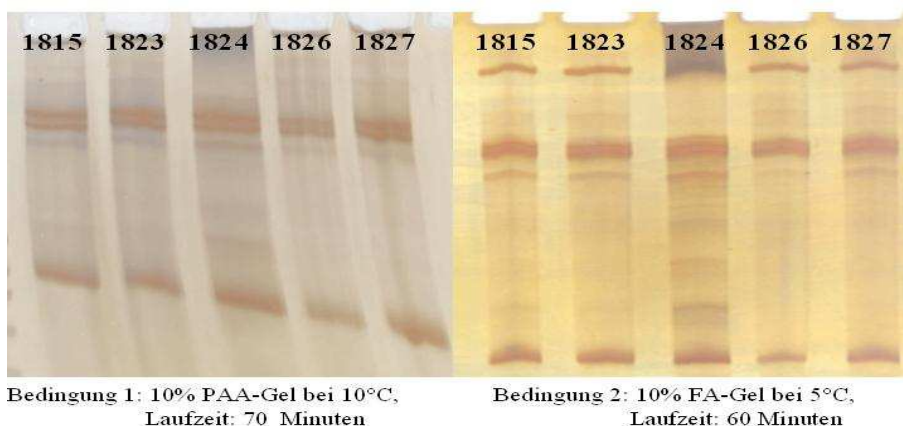


Abbildung 3.17: Darstellung der SSCP-Gele der sequenzierten Proben des Exons 8 des *MYOM*-Gens. Die SSCP-Analyse zeigt ein homogenes Muster in allen Proben. Die Ergebnisse der SSCP-Analyse bestätigen die Ergebnisse der Sequenzierung. Es trat in keiner der Proben ein Sequenzunterschied auf.

3.3 Exon 9 der Myomesin Gen-Analyse

3.3.1 Polymerase-Chain-Reaction (PCR)

Das für Exon 9 entwickelte Primerpaar konnte erfolgreich optimiert werden. Das gesamte DNA-Fragment hatte eine Größe von 346 bp.

Mit Hilfe des DNA-Molekulargewichtsmarkers konnte gezeigt werden, dass das amplifizierte DNA-Fragment im erwarteten Größenbereich lag.

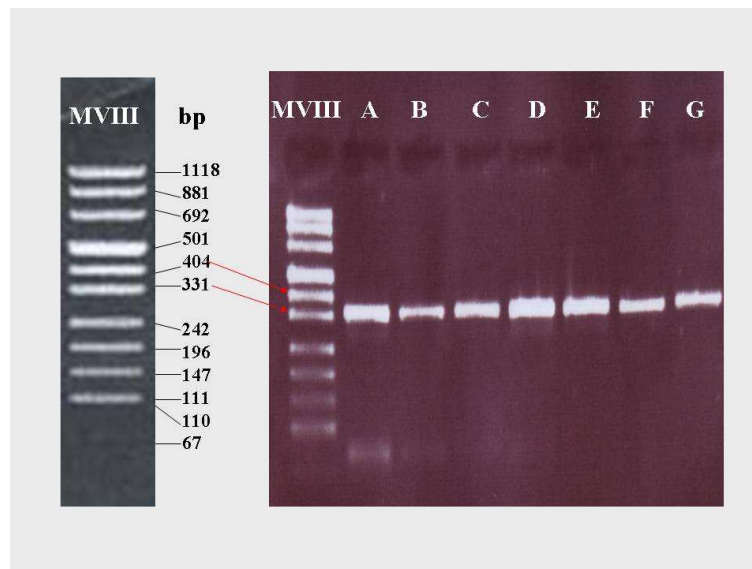


Abbildung 3.18: Optimierung der PCR. Ausschnitt eines 3%igen Agarosegels mit 346-bp PCR-Produkt des Exons 9. A-G: Probanden-DNA; MVIII: Molekulargewichtsmarker.

Es konnten alle DNA-Proben der 410 HCM-Patienten erfolgreich amplifiziert werden.

3.3.2 Single-Strand-Conformation-Polymorphism (SSCP)-Analyse

Nach der Amplifikation der DNA der 410 HCM Patienten mittels PCR wurde die SSCP-Analyse durchgeführt. Für jedes Exon wurden zwei Gele entsprechend der verschiedenen SSCP-Bedingungen angefertigt.

Die Optimierung der SSCP ergab die folgenden zwei Bedingungen:

- A) 10% Polyacrylamid- Gel bei 20°C mit einer Laufzeit von 70 Minuten.
- B) 10% Polyacrylamid-Gel bei 15°C mit einer Laufzeit von 75 Minuten.

SSCP-Gele des Exons 9 des Myomesin-Gens

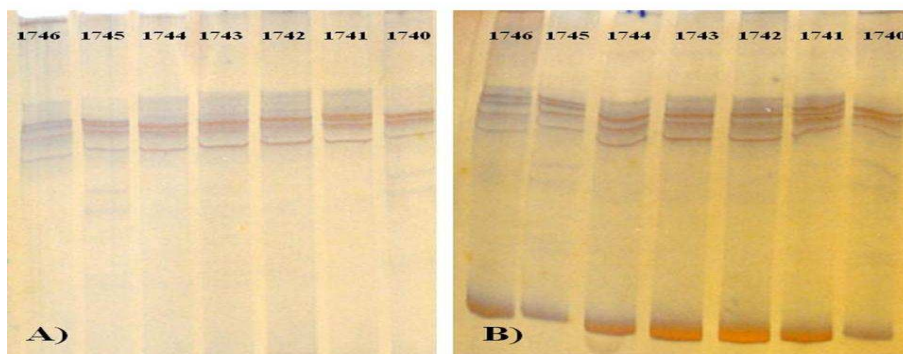


Abbildung 3.19: SSCP-Gele des Exons 9 des *MYOM*-Gens. A) 10% Polyacrylamid- Gel bei 20°C mit einer Laufzeit von 70 Minuten. B) 10% Polyacrylamid-Gel bei 15°C mit einer Laufzeit von 75 Minuten.

Die Ergebnisse der SSCP-Analyse zeigten ein sehr heterogenes Bandenmuster aller DNA-Proben unter beiden Bedingungen. Es wurden allgemein fünf verschiedene SSCP-Bandenmuster identifiziert (A bis E), die sich unter beiden Gel-Bedingungen gut unterscheiden ließen.

Mit Ausnahme der DNA-Probe 1743 (Muster B) entspricht jeder Nukleotid-Sequenzunterschied bzw. SNP einem unterschiedlichen SSCP-Bandenmuster. Das Laufverhalten der DNA-Probe 1743 im SSCP-Gel entspricht dem Muster A. Die Nukleotid-Sequenz der DNA-Probe 1743 entspricht jedoch nicht der sonst für das Muster A gefundenen Nukleotid-Sequenz. Die Ursache dafür, dass Probe 1743 ein identisches SSCP-Laufverhalten wie Muster A aufweist, lässt sich nicht sicher klären. Dies ist das einzige Beispiel in dieser Untersuchung, bei dem ein Nukleotidaustausch keine SSCP-Veränderung verursacht.

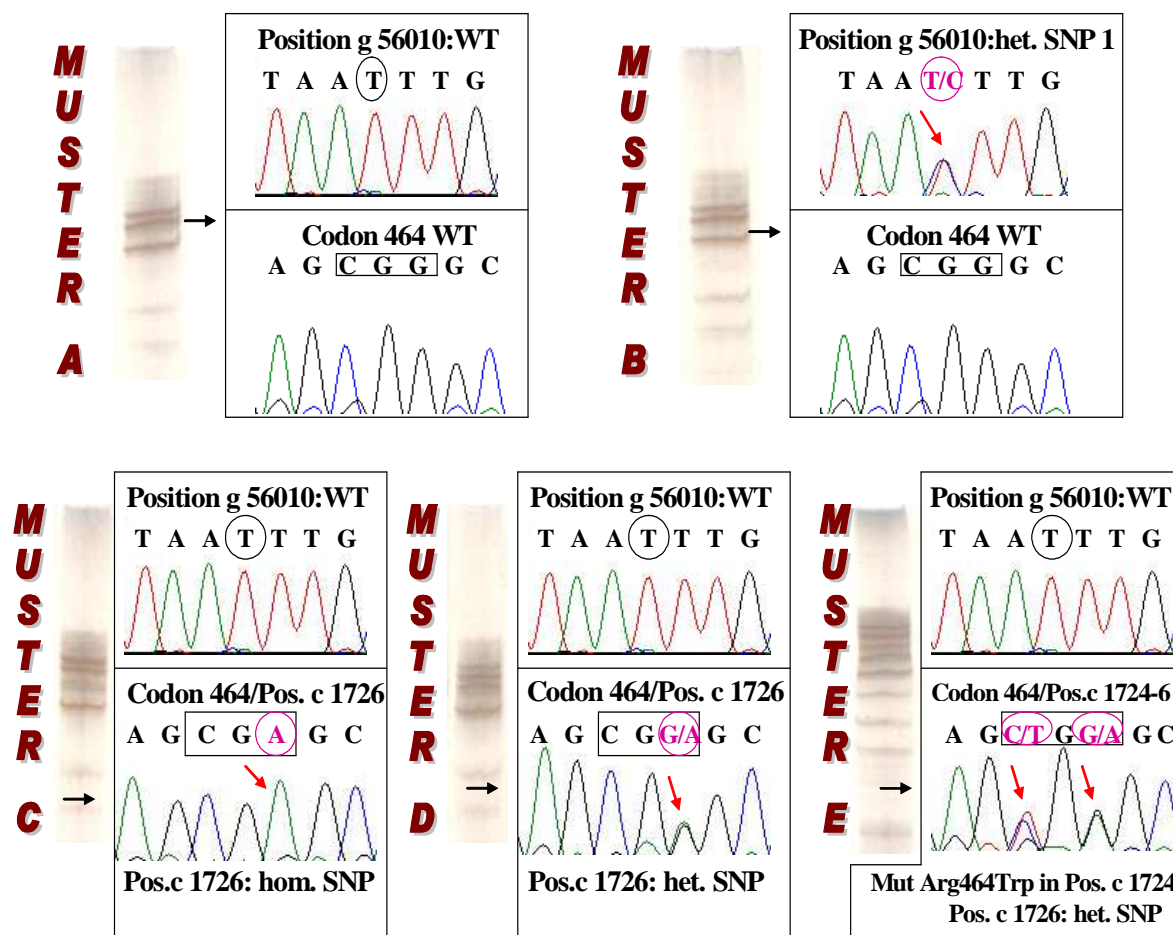


Abbildung 3.20: Darstellung der verschiedenen SSCP-Muster im Exon 9 des *MYOM*-Gens mit den entsprechenden Chromatogrammen. Jeder Nukleotid-Sequenzunterschied verursacht Änderungen des Laufverhaltens in den SSCP-Gelen und somit unterschiedliche SSCP-Bandenmuster. Nur bei einer DNA-Probe dieser Untersuchung (DNA-Probe 1743) verursachte der Basenaustausch Thymin gegen Cytosin in Position g.56010 nicht wie sonst üblich ein abweichendes SSCP-Laufverhalten. Aus diesem Grund weist Muster B (DNA-Probe 1743) keinen Unterschied im SSCP-Laufverhalten im Vergleich zu Muster A auf.

3.3.3 Sequenzierung

Von den untersuchten 410 DNA-Proben wurden neun Proben sequenziert. Diese wurden repräsentativ für die verschiedenen in der SSCP-Analyse gefundenen Muster eingesetzt.

Die unterschiedlichen Bandenmuster aus der SSCP-Analyse ließen sich in der Sequenzierung bestätigen. Dies bedeutet, dass für jedes SSCP-Muster verschiedene Abweichungen der Nukleotid-Sequenz identifiziert werden konnten.

Es wurden drei Stellen innerhalb des PCR-Produktes des Exons 9 erkannt, an denen eine heterozygote Mutation und zwei Polymorphismen (SNPs) auftraten (siehe Tabelle 3.5). Die entsprechenden Positionen sind g.56910 (SNP 1 im Intron), c.1726 (SNP 2 im Exon) und c.1724 (Mutation Arg464Trp). Die Mutation Arg464Trp wurde bei einem einzigen Patienten (DNA-Probe 1058) gefunden, der gleichzeitig auch noch den SNP 2 in Position c.1726 aufweist (siehe Abbildung 3.22, D).

Pat. Nr.	CODON 464		Aminosäure CODON 464
	SNP 1	Mut 1(c.1724) und SNP 2 (c.1726)	
	WT: TT	WT: CC/GG/GG	
Variante 1:	CT	CC/GG/AA	
Variante 2:	-	CC/GG/GA	
Variante 3:	-	CT/GG/GA	
Position:	g.56910	c.1724-c.1726	
Muster A			
1307	TT	WT: CC/GG/GG	ARG
1369	TT	WT: CC/GG/GG	ARG
1399	TT	WT: CC/GG/GG	ARG
1805	TT	WT: CC/GG/GG	ARG
Muster B=A			
1743	CT	WT: CC/GG/GG	ARG
Muster C			
1424	TT	CC/GG/AA	ARG
1806	TT	CC/GG/AA	ARG
Muster D			
1387	TT	CC/GG/GA	ARG/ARG
Muster E			
1058	TT	CT/GG/GA	ARG/TRP

Tabelle 3.5: Verschiedene Polymorphismen (SNPs) und Mutation in Exon 9 des *MYOM*-Gens. Innerhalb des PCR-Produktes von Exon 9 wurden drei Stellen identifiziert, an denen SNPs und eine Mutation auftraten. Der SNP 1 (SNP g.56910) trat im intronische Bereich auf. Die Mutation 1 (c.1724) und der SNP 2 (c.1726) traten am gleichen Codon (Codon 464) auf. WT: Wild Typ; g: genomische DNA; c: kodierende DNA; ARG: Arginin; TRP: Tryptophan.

3.3.3.1 Polymorphismus (SNP) im Intron 8 des Myomesin-Gens

Der SNP in der Position g.56910 wurde bei einem einzelnen Patienten (1743) identifiziert. Die Sequenz-Analyse ergab einen heterozygoten SNP, bei dem die Base Thymin gegen Cytosin ausgetauscht war. Die SSCP-Analyse ergab jedoch kein neues Muster für diesen SNP. Das Muster der Probe des Patienten 1743 entsprach vielmehr dem beim Wild Typ (Muster A) gefundenen Bandenmuster (siehe Abbildung 3.20).

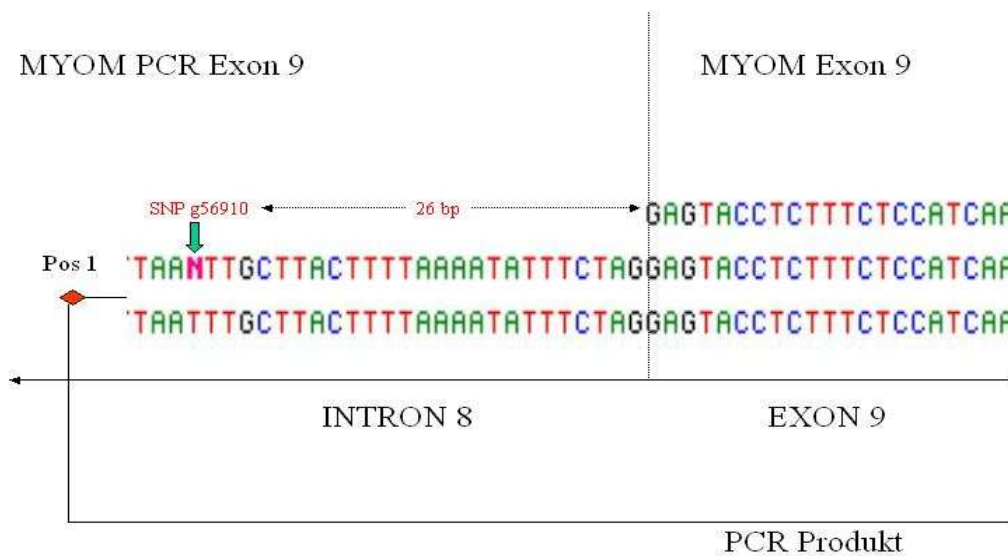


Abbildung 3.21: Darstellung des SNP in der Position g.56910 des *MYOM*-Gens. Der heterozygote SNP g.56910 befindet sich 26 bp vom Anfang des Exons 9 entfernt.

Gemäß des angegebenen Beispiels für die Grundstruktur der "Splice Site" (siehe Diskussion, Abbildung 4.2), könnte sich der SNP g.56910 innerhalb des "Splice Site"-Bereichs befinden, da er nur 26 bp vom Anfang des Exons 9 entfernt liegt. Träfe dies zu, könnte dies eine anormale Funktion des "Alternative Splicing" verursachen und somit einen Faktor für das Auftreten einer genetischen Krankheit darstellen (Cáceres und Kornblihtt, 2002; Cartegni *et al.*, 2002; Matlin *et al.*, 2005).

3.3.3.2 Polymorphismus (SNP) im Exon 9 des Myomesin-Gens

In Position c.1726 (Codon 464) wurde ein häufiger SNP (SNP 2/c.1726) mit zwei verschiedenen Varianten (heterozygote/homozygote) identifiziert. Die Sequenz-Analyse ergab die folgenden Ergebnisse:

SNP Wild Typ in Position c.1726: homozygot (G-G).

SNP c.1726 (1): stille homozygote Variante (A-A).

SNP c.1726 (2): stille heterozygote Variante (G-A).

Bei SNP c.1726 ist die Aminosäure Arginin im Codon 464 betroffen. Dabei wurde die Base Guanin gegen Adenin in beiden Varianten ausgetauscht. Bei SNP c.1726 (1) ergab sich der Basenaustausch Guanin gegen Adenin in beiden Allelen. Bei SNP c.1726 (2) ergab sich der Basenaustausch Guanin gegen Adenin in nur einem Allel. Dieser Basenaustausch verursacht keinen Austausch der Aminosäure (Arg464Arg).

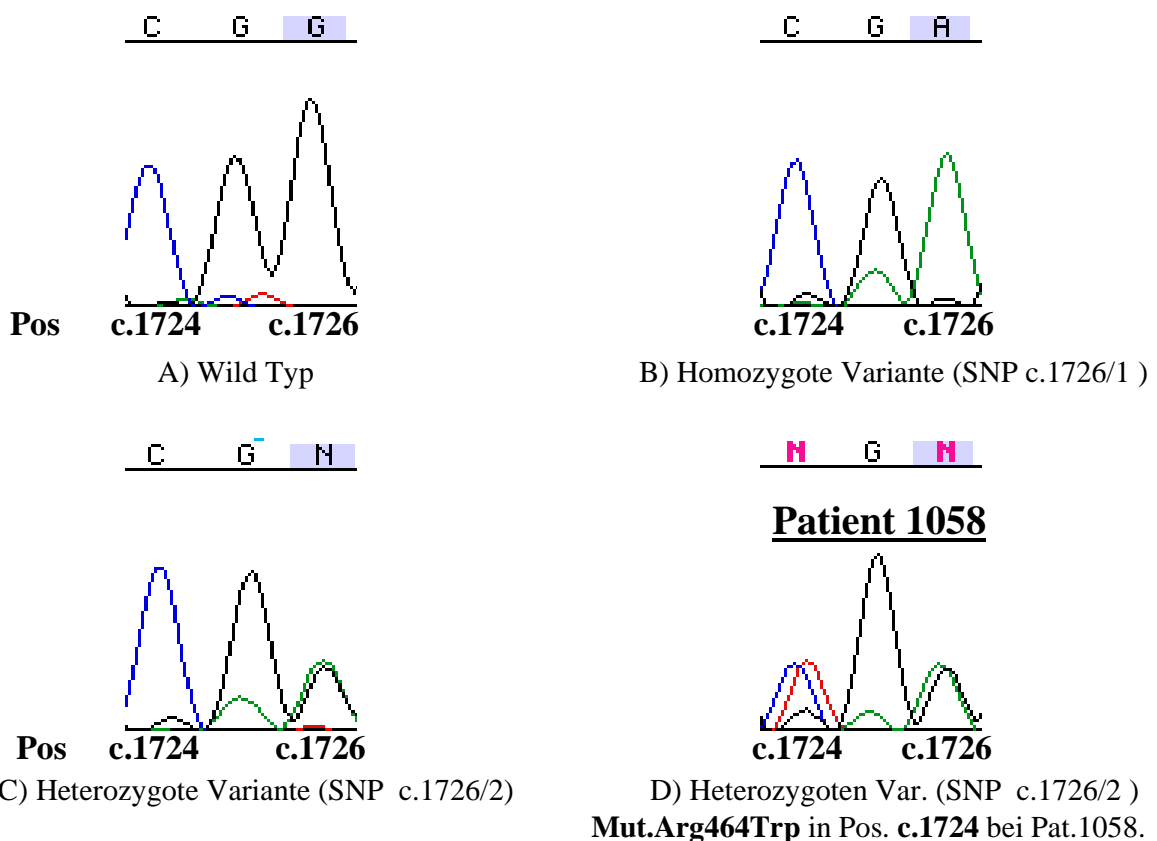


Abbildung 3.22: Darstellung des Codons 464 des *MYOM*-Gens. A) Wild Typ (DNA-Proben: 1307,1369,1399 und 1801); B) SNP c.1726 (1): Homozygote Variante der dritten Base des Codons 464 (DNA-Proben: 1424 und 1806); C) SNP c.1726 (2): Heterozygote Variante der dritten Base des Codons 464 (DNA- Proben 1058 und 1387), N bezeichnet hier die Basen Adenin und Guanin und kennzeichnet die Position des heterozygoten SNP; D) Mutation Arg464Trp: Heterozygote Mutation (N=Cytosin>Thymin) in der ersten Base des Codons 464 und heterozygoter SNP (N=Guanin>Adenin) in der dritten Base des Codons 464 (DNA-Probe: 1058), (siehe Text 3.3.3.3).

3.3.3.3 Mutation Arg464Trp in Exon 9 des Myomesin-Gens

In Position c.1724 (Codon 464) wurde bei einem Patienten (1058) eine heterozygote Mutation identifiziert, die die Aminosäure Arginin im Codon 464 betraf. Dabei wurde die Base Cytosin gegen Thymin ausgetauscht. Dieser Basenaustausch verursacht den Aminosäureaustausch Arginin gegen Tryptophan (Arg464Trp) (siehe Abbildung 3.22,D). Außerdem zeigt die Sequenz-Analyse für Patient 1058 nicht nur die Arg464Trp Mutation, sondern auch den

heterozygoten SNP in Position c.1726 (SNP c.1726 (2)), welcher im gleichen Codon (Codon 464) auftritt.

3.3.4 Mutation Arg464Trp.

3.3.4.1 Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus (RFLP),

Restriktionsenzymverdau mit MwoI und AclI.

Die Identifizierung eines SNP (c.1726) und einer Mutation (c.1724) im gleichen Codon (Codon 464) des *MYOM*-Gens in DNA-Probe 1058 machte weitere Untersuchungen nötig, um zu erkennen, unter welcher Kombination die Mutation Arg464Trp im Codon 464 auftritt. Die Mutation Arg464Trp sowie der SNP c.1726 (2) stellten sich als heterozygote Varianten dar. Wenn sich für eines der beiden Allele in den ersten Basen des Codons 464 der Basenaustausch Thymin für Cytosin ergibt, welche Base kommt dann an dritter Stelle des Codons 464 vor? Tritt Adenin oder Guanin auf?

Es gibt zwei mögliche Kombinationen:

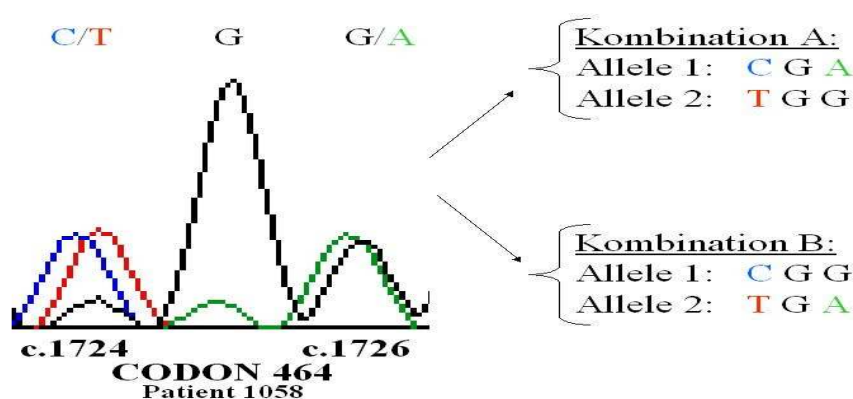


Abbildung 3.23: Chromatogramm des Codons 464 im Exon 9 des *MYOM*-Gens. Die Abbildung zeigt die Ergebnisse der Sequenzierung der DNA-Probe 1058 sowie die verschiedenen Nukleotid-Kombinationen, die vorkommen können. Allein mit dem Ergebnis der Sequenzierung lässt sich nicht erkennen, welche Nukleotid-Kombination im Codon 464 des Exons 9 bei dieser DNA-Probe auftritt.

Bei Kombination A tritt bei Allel 1 (CGA) weder eine Mutation noch der heterozygote SNP c.1726 (2) auf. Bei Allel 2 (TGG) tritt die Mutation Arg464Trp auf, jedoch kein SNP.

Bei der Kombination B tritt bei Allel 1 (CGG) keine Mutation und kein SNP auf. Bei Allel 2 (TGA) tritt sowohl die Mutation Arg464Trp als auch der heterozygote SNP c.1726 (2) auf. Träfe diese Kombination zu, wäre TGA bei Allel 2 ein Stopcodon. Dies würde das Ende der kodierenden Region an dieser Stelle und einen deutlichen Schaden für das zu kodierende Protein bedeuten.

Die Identifizierung der Kombination fand mit Hilfe der Restriktionsenzyme MwoI und AciI statt. MwoI hat nur ein Schnittstelle innerhalb des Exon 9-PCR-Produktes in Position 149 (c.1729) und schneidet in diesen Fall die Wild Typ-Variante CGG sowie die Nukleotid-Kombination CGA in Codon 464. Im Gegensatz dazu schneidet AciI nur bei der Kombination CGG in Codon 464 (Wild Typ) in Position 143 des Exon 9-PCR-Produktes (c.1723). Für die Nukleotid-Kombinationen TGA und TGG in Codon 464 wurde kein Restriktionsenzym gefunden.

Nach Enzymverdau des Exon 9-PCR-Produktes mit MwoI sind zwei DNA-Fragmente von jeweils 167 und 179 bp zu erwarten, während nach Enzymverdau mit AciI zwei DNA-Fragmente von jeweils 161 und 185 bp zu erwarten sind.

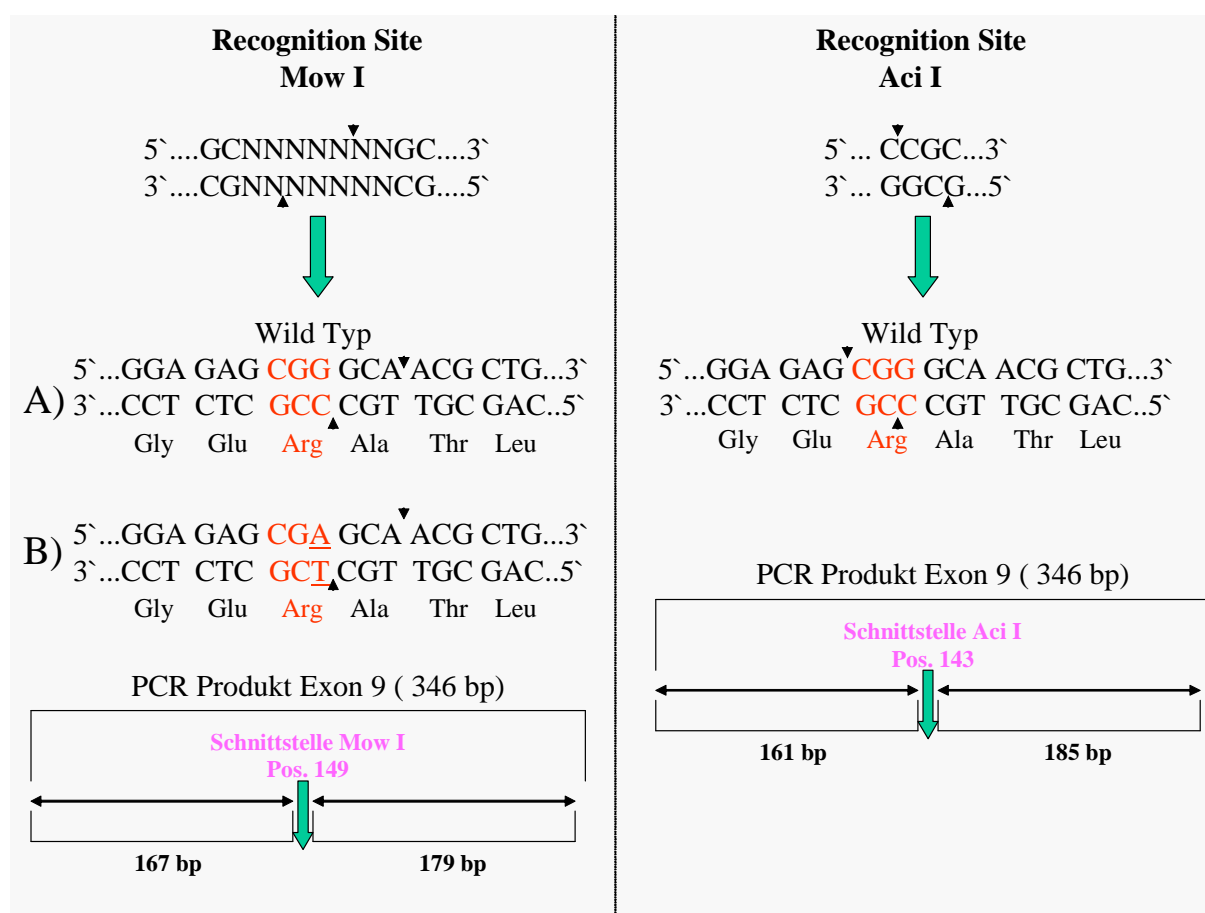


Abbildung 3.24: Darstellung der Schnittstellen des Restriktionsverdau mit MwoI und AciI und Nukleotid-Sequenz der Codons 362-367 des *MYOM*-Gens. MwoI schneidet in Position 149 (c.1729) des PCR-Produktes des Exons 9 bei nicht-mutierter Sequenz (CGG) und beim SNP c.1726 (1) in Codon 464 (Variante CGA). AciI schneidet nur bei nicht-mutierter Sequenz (CGG) in Position 143 (c.1723) des PCR-Produktes des Exons 9. Das PCR-Produkt des Exons 9 ist 346-bp lang.

Wenn eine DNA-Probe mit beiden Enzymen MwoI und AciI geschnitten werden kann, bedeutet dies, dass die Wild Typ-Variante CGG in Codon 464 des *MYOM*-Gens vorkommt. Wenn die Probe nur mit MwoI und nicht mit AciI geschnitten wird, kommt die Variante CGA

in Codon 464 vor. Wenn sich nach Einsatz von MwoI und AciI kein Verdau nachweisen lässt, handelt es sich entweder um die Variante TGA (Stopcodon) oder um die Variante TGG.

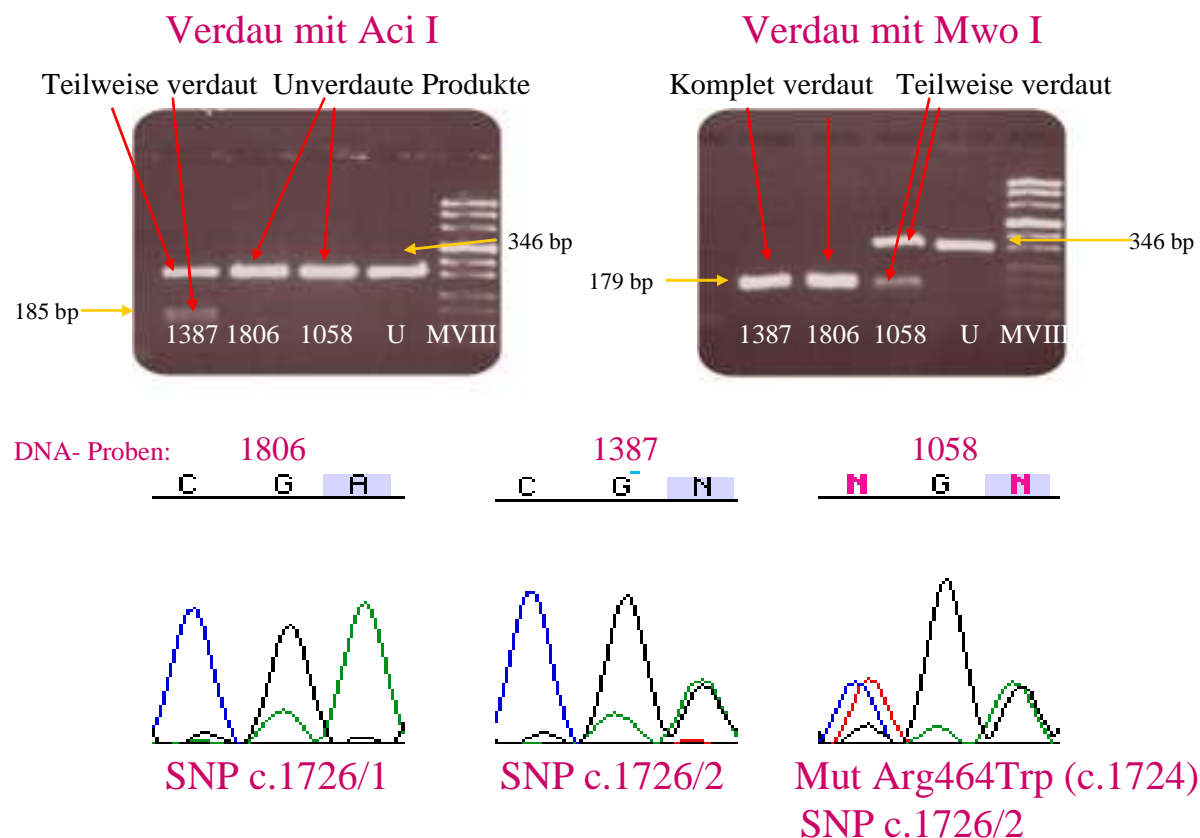


Abbildung 3.25: Oben: Darstellung des Restriktionsverdaus mit AciI und MwoI. U: Unverdaute PCR-Produkte. Das Restriktionsenzym AciI schneidet die PCR-Produkte des Exons 9 in Position 143 (c.1723) bei nicht mutierter Sequenz (CGG in Codon 464). Nach Restriktionsverdau mit AciI wurden die DNA-Proben 1058 und 1806 nicht verdaut. Die DNA-Probe 1387 wurde teilweise verdaut, weil bei der heterozygoten Variante in Codon 464, SNP c.1726 (2) eines der Allele die normale Sequenz (CGG) aufwies. Das Restriktionsenzym MwoI schneidet die PCR-Produkte des Exons 9 in Position 149 (c.1729) bei nicht mutierter Sequenz (CGG in Codon 464) und bei Vorliegen des SNP c.1726 (1) CGA in Codon 464. Die DNA-Proben 1387 und 1806 wurden vollständig verdaut. Die DNA-Probe 1058 wurde teilweise verdaut, was bedeutet, dass die zwei Allele des Codons 464 des *MYOM*-Gens in DNA-Probe 1058 jeweils die Konstellation CGA und TGG aufweisen.

Unten: Chromatogramme der verschiedenen Varianten im Codon 464 des Exons 9 des *MYOM*-Gens.

Insgesamt wurden die 9 Proben, die zur Sequenzierung ausgewählt wurden (siehe Tabelle 3.5), zusammen mit 146 Kontrollen verdaut. Die Ergebnisse des Restriktionsverdaus mit MwoI und AciI haben bei den 9 sequenzierten Proben die Ergebnisse der Sequenz-Analyse bestätigt. Bei DNA-Probe 1058 ließ sich die tatsächliche Nucleotid-Kombination herausfinden. Die DNA-Probe 1058 wurde nach Restriktionsenzymverdau mit AciI nicht verdaut, was bedeutet, dass die Sequenz im Codon 464 des *MYOM*-Gens nicht die Kombination CGG aufwies. Durch diese Ergebnisse ließ sich die Kombination B (siehe Abbildung 3.23) ausschließen. Im Gegensatz dazu wurde die DNA-Probe 1058 durch MwoI

teilweise verdaut. Dies bedeutet, dass die zwei Allele des Codons 464 des *MYOM*-Gens in DNA-Probe 1058 jeweils die Konstellation CGA und TGG aufweisen (Abbildung 3.23; Kombination A und Abbildung 3.25).

In den restlichen 146 DNA-Kontrollen ließ sich die heterozygote Konstellation A nicht weiter bestätigen. Die Ergebnisse des Restriktionsverdaus mit *AcuI* haben gezeigt, dass der homozygote SNP c.1726 (1) (Variante CGA in Codon 464; siehe Abbildung 3.22, B) häufig vorkommt.

3.3.4.2 Mutation Arg464Trp bei Familie mit bekannter β -myosin-heavy-chain-Arg403Trp-Mutation identifiziert

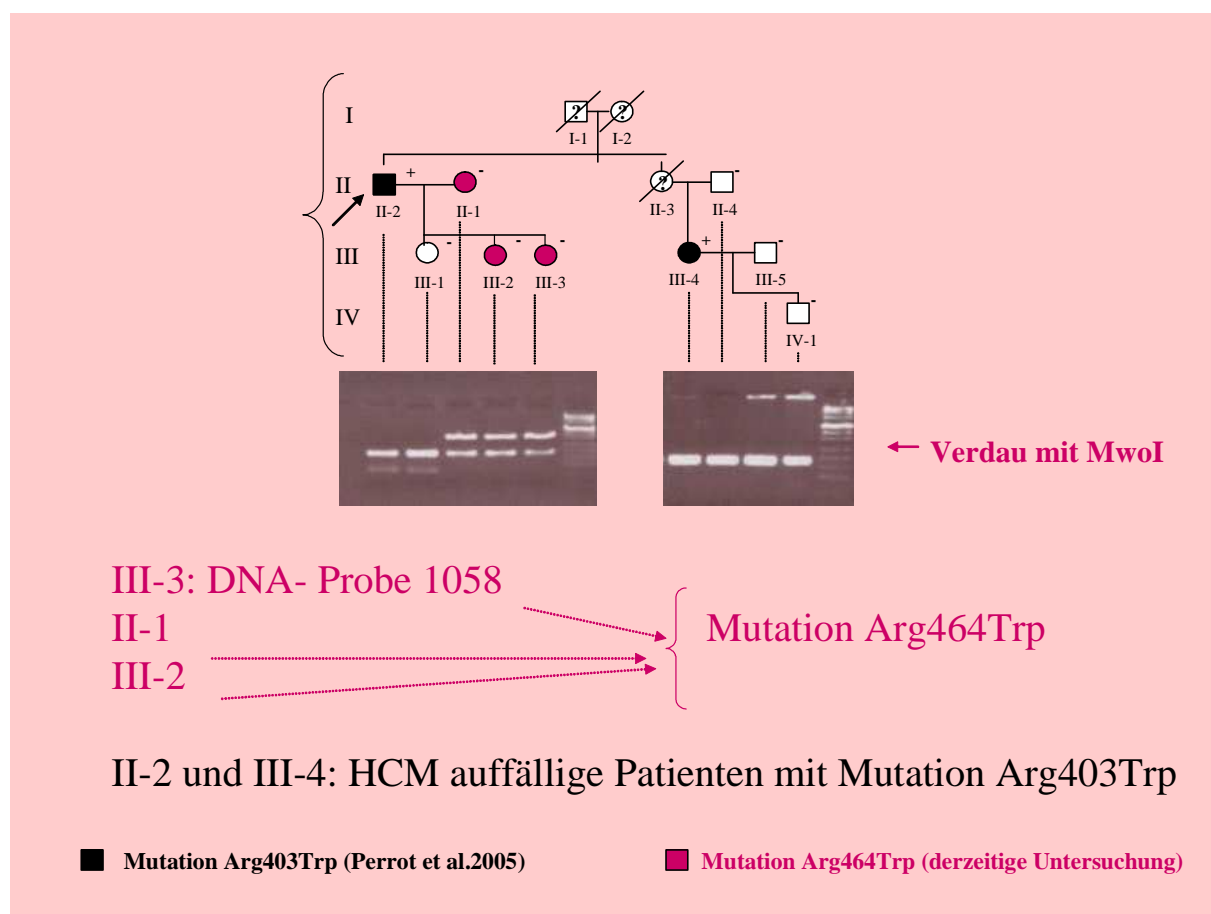


Abbildung 3.26: Stammbaum der Familie C (Perrot *et al.* 2005) und Darstellung des Verdaus des Exons 9 des *MYOM*-Gens mittels Restriktionsenzym *MwoI* bei Familie C (derzeitige Untersuchung). Im Stammbaum: Quadrat: Männer; Kreis: Frauen; schwarz: HCM-auffällige Probanden mit Arg403Trp-Mutation; lila: HCM-unauffällige Probanden mit Arg464Trp-Mutation; weiß: unauffällige oder unbekannte Probanden. Die Mutation Arg464Trp tritt bei drei HCM-unauffälligen Probanden auf (III-3: DNA-Probe 1058, II-1, III-2). Weitere Restriktionsverdau-Untersuchungen mit *MwoI* haben bei 146 Kontrollen die Mutation Arg464Trp nicht nachweisen können.

Die Mutation Arg464Trp in Codon 464 des *MYOM*-Gens wurde bei einer HCM-unauffälligen Probandin (DNA-Probe 1058) identifiziert. Die Probandin gehört zu einer HCM-Familie, in

der eine Mutation der β -myosin-heavy-chain (Arg403Trp) in vorangegangenen Arbeiten identifiziert werden konnte (Perrot *et al.*, 2005).

Mit Hilfe des Restriktionsverdau mit MwoI konnte die Mutation Arg464Trp noch bei zwei weiteren HCM-unauffälligen Angehörigen der Familie C identifiziert werden (siehe Stammbaum Abbildung 3.26). Weitere Restriktionsverdau-Untersuchungen mit MowI haben bei 146 Kontrollen die Mutation Arg464Trp nicht nachweisen können. Es besteht eine enge Verwandtschaft zwischen den Probandinnen, die die Arg464Trp-Mutation aufweisen (Mutter und ihre zwei Töchter). Diese Probandinnen waren klinisch unauffällig. Die echokardiographische Evaluation konnte keinen pathologischen Befund nachweisen, die elektrokardiographischen Untersuchungen waren ebenfalls unauffällig. Da keine der Probandinnen mit der Arg464Trp Mutation an Hypertropher Kardiomyopathie leidet, konnte kein Zusammenhang zwischen der identifizierten Mutation Arg464Trp und der Entstehung der Krankheit hergestellt werden.

3.4 Exon 22 der Myomesin Gen-Analyse

3.4.1 Polymerase-Chain-Reaction (PCR)

Das für Exon 22 entwickelte Primerpaar konnte erfolgreich optimiert werden. Das gesamte DNA-Fragment hatte eine Größe von 306 bp.

Mit Hilfe des DNA-Molekulargewichtsmarkers konnte gezeigt werden, dass das amplifizierte DNA-Fragment im erwarteten Größenbereich lag.

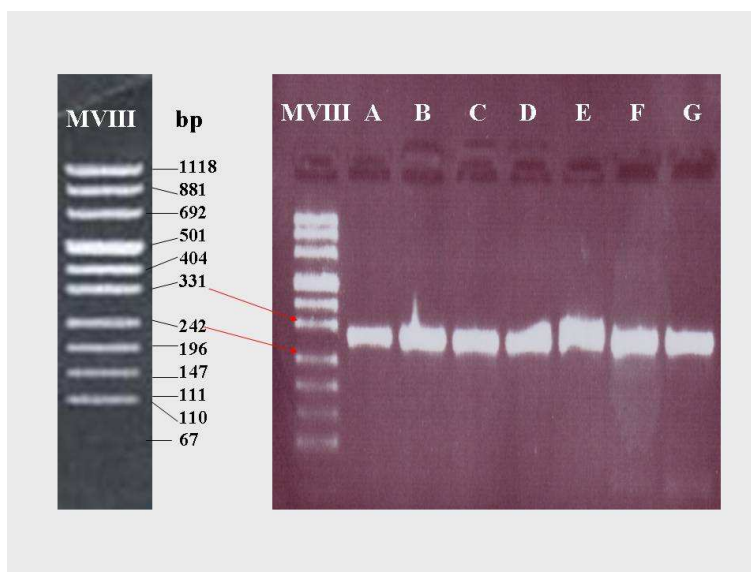


Abbildung 3.27: Optimierung der PCR. Ausschnitt eines 3%igen Agarosegels mit 306-bp PCR-Produkt des Exons 22. A-G: Probanden-DNA; MVIII: Molekulargewichtsmarker.

Es konnten alle DNA-Proben der 410 HCM-Patienten erfolgreich amplifiziert werden.

3.4.2 Single-Strand-Conformation-Polymorphism (SSCP)-Analyse

Nach der Amplifikation der DNA der 410 HCM-Patienten mittels PCR wurde die SSCP-Analyse durchgeführt. Für jedes Exon wurden zwei Gele entsprechend der verschiedenen SSCP-Bedingungen angefertigt.

Die Optimierung der SSCP ergab die folgenden zwei Bedingungen:

- A) 10% Polyacrylamid- Gel bei 15°C mit einer Laufzeit von 70 Minuten.
- B) 10% Formamid- Gel bei 10°C mit einer Laufzeit von 50 Minuten.

SSCP-Gele des Exons 22 des Myomesin-Gens

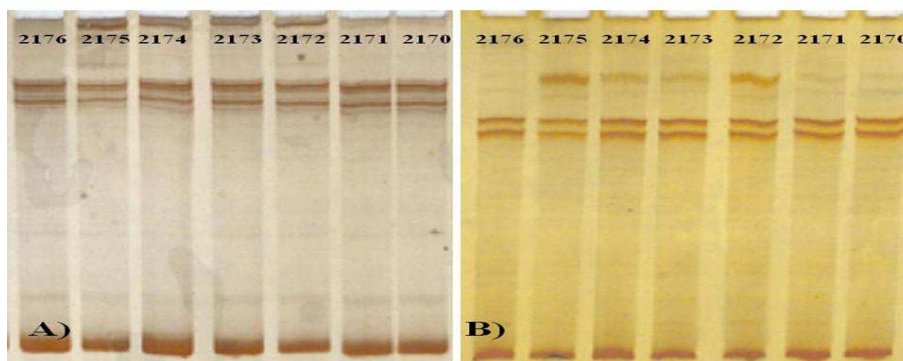


Abbildung 3.28: SSCP-Gele des Exons 22 des Myomesin-Gens. A) 10% Polyacrylamid-Gel bei 15°C mit einer Laufzeit von 70 Minuten. B) 10% Formamid bei 10°C mit einer Laufzeit von 50 Minuten.

Die SSCP-Analyse des Exons 22 zeigte ein sehr homogenes SSCP-Bandenmuster. Keine der 410 untersuchten DNA-Proben zeigte eine Auffälligkeit. Dennoch wurden 17 Proben (1049, 1105, 1111, 1112, 1136, 1199, 1247, 1255, 1279, 1283, 1360, 1444, 1460, 1646, 2181, 2188, 2205) als Kontrolle zur Sequenzierung ausgewählt.

3.4.3 Sequenzierung

Siebzehn ausgewählte DNA-Proben wurden sequenziert. Keine der ausgewählten Proben zeigte Auffälligkeiten in der SSCP-Analyse. Die Sequenz-Analyse bestätigte die Ergebnisse der SSCP-Analyse, da keine Sequenzunterschiede auftraten. Die sequenzierten Proben des Exons 22 hatten die gleiche Sequenz wie die Referenzsequenz mit der GenBank-Nummer NT_010859. Aus Platzgründen wird die Nukleotid-Sequenz des Exons 22 nicht gezeigt.



Abbildung 3.29: Darstellung der SSCP-Gele der sequenzierten Proben des Exons 22 des *MYOM*-Gens. Die SSCP-Analyse zeigt ein homogenes SSCP-Bandenmuster in allen Proben. Die Ergebnisse der SSCP-Analyse bestätigen die Ergebnisse der Sequenzierung. Es trat in keiner der Proben ein Nukleotid-Sequenzunterschied auf.

3.5 Exon 23/24 der Myomesin Gen-Analyse

3.5.1 Polymerase-Chain-Reaction (PCR)

Exon 23 und 24 wurden aufgrund ihrer geringen Länge (Exon 23: 107 bp und Exon 24: 45 bp) und der engen Nachbarschaft (118 bp Entfernung) gemeinsam in einem Stück mit einem Vorwärts- und Rückwärts-Primer amplifiziert. Das für Exon 23/24 entwickelte Primerpaar konnte erfolgreich optimiert werden. Das gesamte DNA-Fragment hatte eine Größe von 479 bp. Mit Hilfe des DNA-Molekulargewichtsmarkers konnte gezeigt werden, dass das amplifizierte DNA-Fragment im erwarteten Größenbereich lag.

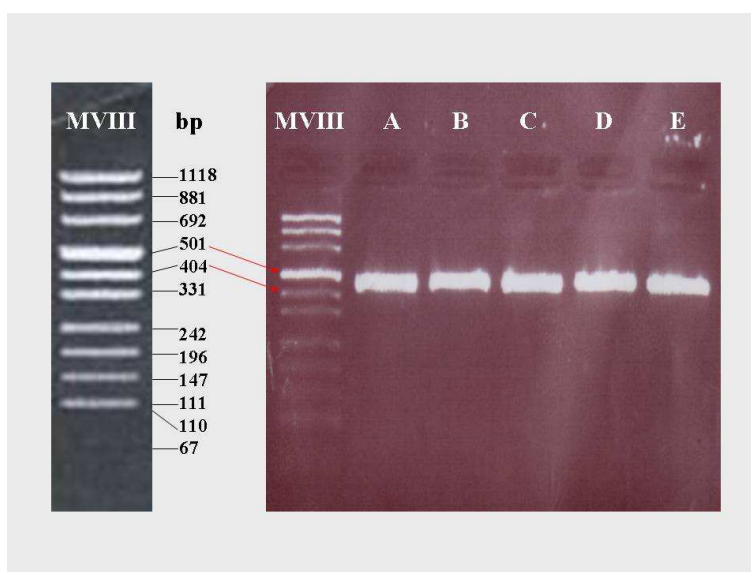


Abbildung 3.30: Optimierung der PCR. Ausschnitt eines 3%igen Agarosegels mit 479-bp PCR-Produkt des Exons 23/24. A-E: Probanden-DNA; MVIII: Molekulargewichtsmarker.

Es konnten alle DNA-Proben der 410 HCM-Patienten erfolgreich amplifiziert werden.

3.5.2 Single-Strand-Conformation-Polymorphism (SSCP)-Analyse

Nach der Amplifikation der DNA der 410 HCM Patienten mittels PCR wurde die SSCP-Analyse durchgeführt. Für jedes Exon wurden zwei Gele entsprechend der verschiedenen SSCP-Bedingungen angefertigt.

Die Optimierung der SSCP ergab die folgenden zwei Bedingungen:

A) 10% Polyacrylamid- Gel bei 15°C mit einer Laufzeit von 70 Minuten.

B) 10% Formamid- Gel bei 10°C mit einer Laufzeit von 50 Minuten.

SSCP-Gele der Exone 23/24 des Myomesin-Gens

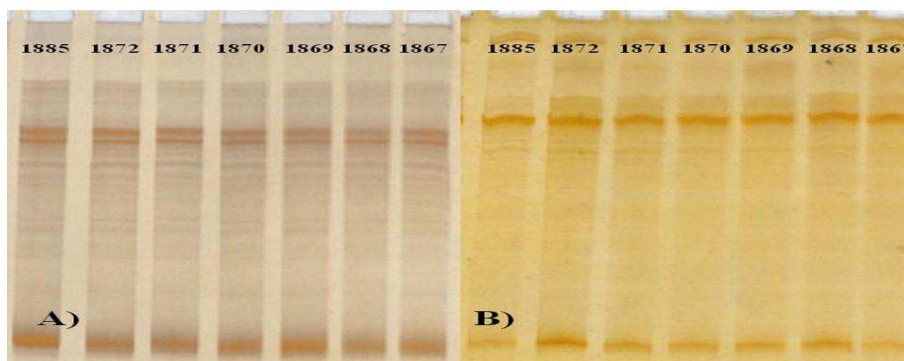


Abbildung 3.31: SSCP-Gele der Exone 23/24 des Myomesin-Gens. A) 10% Polyacrylamid-Gel bei 15°C mit einer Laufzeit von 70 Minuten. B) 10% Formamid bei 10°C mit einer Laufzeit von 50 Minuten.

Die SSCP-Analyse des Exons 23/24 zeigte ein heterogenes SSCP-Bandenmuster. Die Ergebnisse dieses Exons beweisen, dass Variationen der Nukleotid-Sequenz in nur einer einzigen Base Veränderungen des Laufverhaltens der DNA-Proben im SSCP-Gel verursachen können. Insgesamt wurden drei verschiedene Bandenmuster bei der SSCP-Analyse identifiziert. Die unterschiedlichen SSCP-Bandenmuster ließen sich am besten in Gel A erkennen. Die Vielfältigkeit der Bandenmuster aus der SSCP-Analyse ließ sich in der Sequenzierung bestätigen. Dies bedeutet, dass die Vielfältigkeit der Muster durch die unterschiedlichen gefundenen Variationen der Nukleotid-Sequenzen verursacht wurde. Die nächste Abbildung zeigt die drei in der SSCP-Analyse gefundenen Muster. Muster A ist durch zwei Banden, Muster B durch zwei doppelte Banden und Muster C durch eine obere und eine untere doppelte Bande charakterisiert.

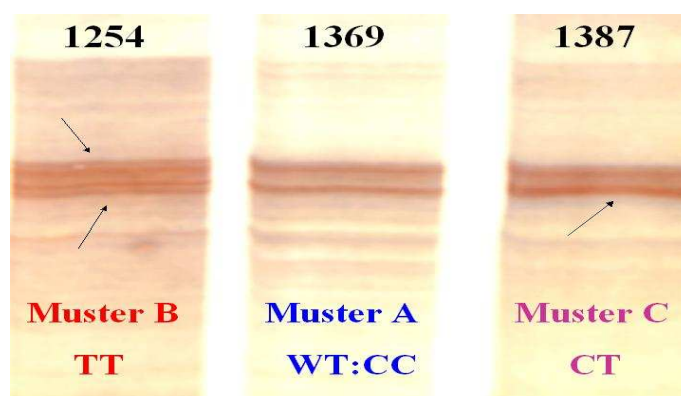


Abbildung 3.32: Darstellung der drei verschiedenen SSCP-Bandenmuster des Exons 23/24. Die Ergebnisse der Sequenzierung beweisen, dass Variationen der Sequenz einer einzigen Base in Position g.121255 Veränderungen des Laufverhaltens der DNA-Proben im SSCP-Gel und daher die drei verschiedenen Muster verursachen. Die Pfeile zeigen die doppelten Banden. 10% Polyacrylamid-Gel bei 15°C mit einer Laufzeit von 70 Minuten.

3.5.3 Sequenzierung: Polymorphismus im Intron 22 des Myomesin-Gens

Von allen 410 untersuchten DNA-Proben wurden 13 Proben zur Sequenzierung ausgewählt. Bei der Sequenzierung wurde in Position g.121255 ein intronischer SNP identifiziert. Für jedes in der SSCP-Analyse gefundene Muster (A bis C) wurde bei der Sequenzierung ein entsprechender Sequenzunterschied identifiziert. Die nächste Tabelle zeigt die Ergebnisse der Untersuchung des Exons 23/24.

Patienten Nr.	SNP g.121255	
	WT	CC
	SNP 1	TT
	SNP 2	CT
	Pos.	g.121255 (Intron)
Muster A		
1112		CC
1113		CC
1369		CC
2174		CC
2176		CC
Muster B		
1214		TT
1254		TT
2175		TT
2181		TT
Muster C		
1387		CT
2177		CT
2180		CT
2182		CT

Tabelle 3.6: Polymorphismus (SNP) im Intron 22 des *MYOM*-Gens. Innerhalb des PCR-Produktes des Exons 23/24 wurde eine Stelle identifiziert, an der ein SNP auftritt. Dieser Sequenzunterschied verursacht die drei in der SSCP-Analyse gefundenen Bandenmuster.

Die Sequenz-Analyse ergab einen Polymorphismus (SNP) in Position g.121255 mit unterschiedlichen Varianten: Wild Typ g.121255, homozygot (C-C); SNP g.121255(1), homozygote Variante (T-T) und SNP g.121255(2), heterozygote Variante (C-T).

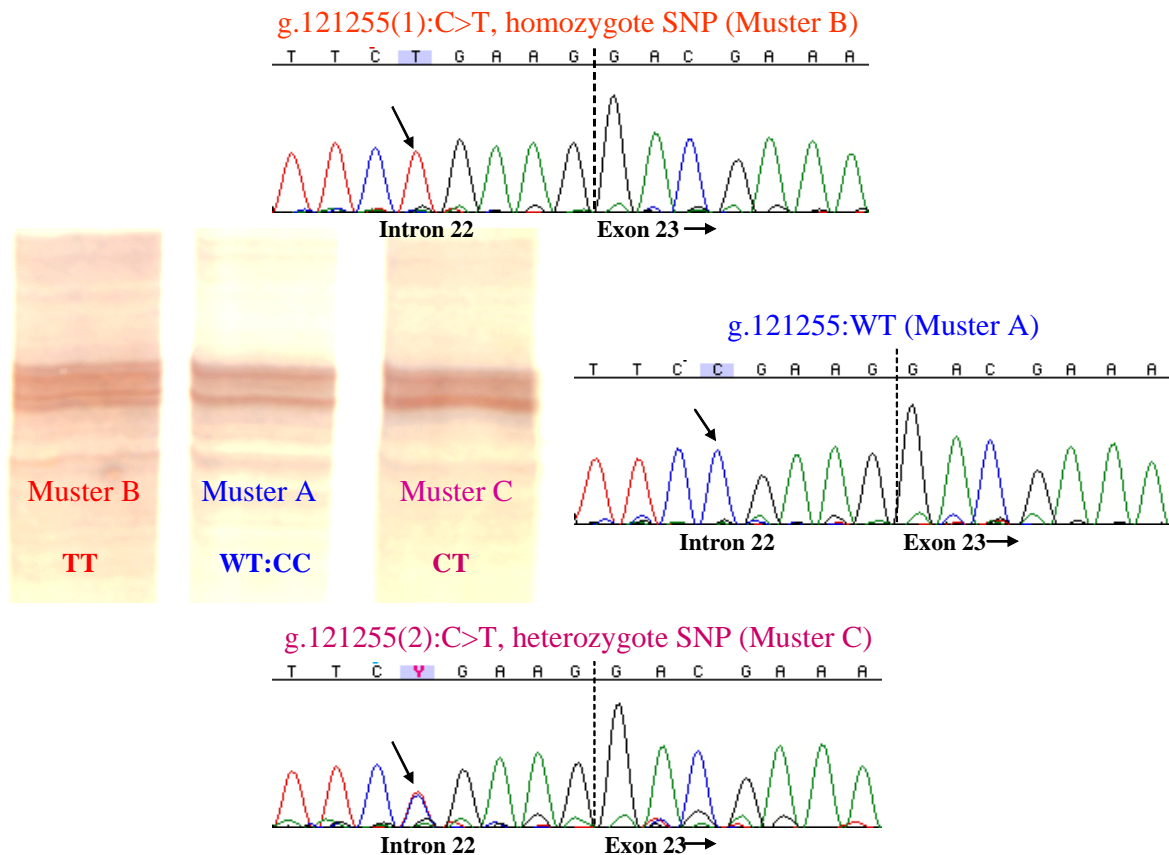


Abbildung 3.33: Darstellung der verschiedenen identifizierten SSCP-Bandenmuster der SSCP-Analyse der Exone 23/24 des *MYOM*-Gens und Chromatogramme der drei verschiedenen Varianten in Position g.121255 des *MYOM*-Gens. Muster A entspricht der Wild Typ-Variante in Position g.121255. Muster B entspricht dem homozygoten SNP g.121255(1). Muster C entspricht dem heterozygoten SNP g.121255(2). Die SSCP-Analyse der Exone 23/24 zeigte keine weiteren Nukleotid-Sequenzunterschiede. Dies veranschaulicht, dass ein einziger Nukleotidbasenaustausch Veränderungen der SSCP-Bandenmuster verursachen kann. Desweiteren beweist dies die hohe Sensitivität der SSCP-Methode für die Mutationsdetektion. Die Pfeile im Chromatogramm zeigen die Position g.121255 des *MYOM*-Gens an.

Der SNP in Position g.121255 befindet sich 5 Basen vom Anfang des Exons 23 des *MYOM*-Gens entfernt. Gemäß des angegebenen Beispiels für die Grundstruktur der “Splice Site“ (siehe Diskussion, Abbildung 4.2) könnte sich der SNP g.121255 innerhalb des “Splice Site“-Bereichs befinden, da er nur 5 bp entfernt vom Anfang des Exons 23 liegt. Träfe dies zu, könnte dies eine anormale Funktion des “Alternative Splicing“ verursachen und somit einen Faktor für das Auftreten einer genetischen Krankheit darstellen (Cáceres und Kornblihtt, 2002; Cartegni *et al.*, 2002; Matlin *et al.*, 2005).

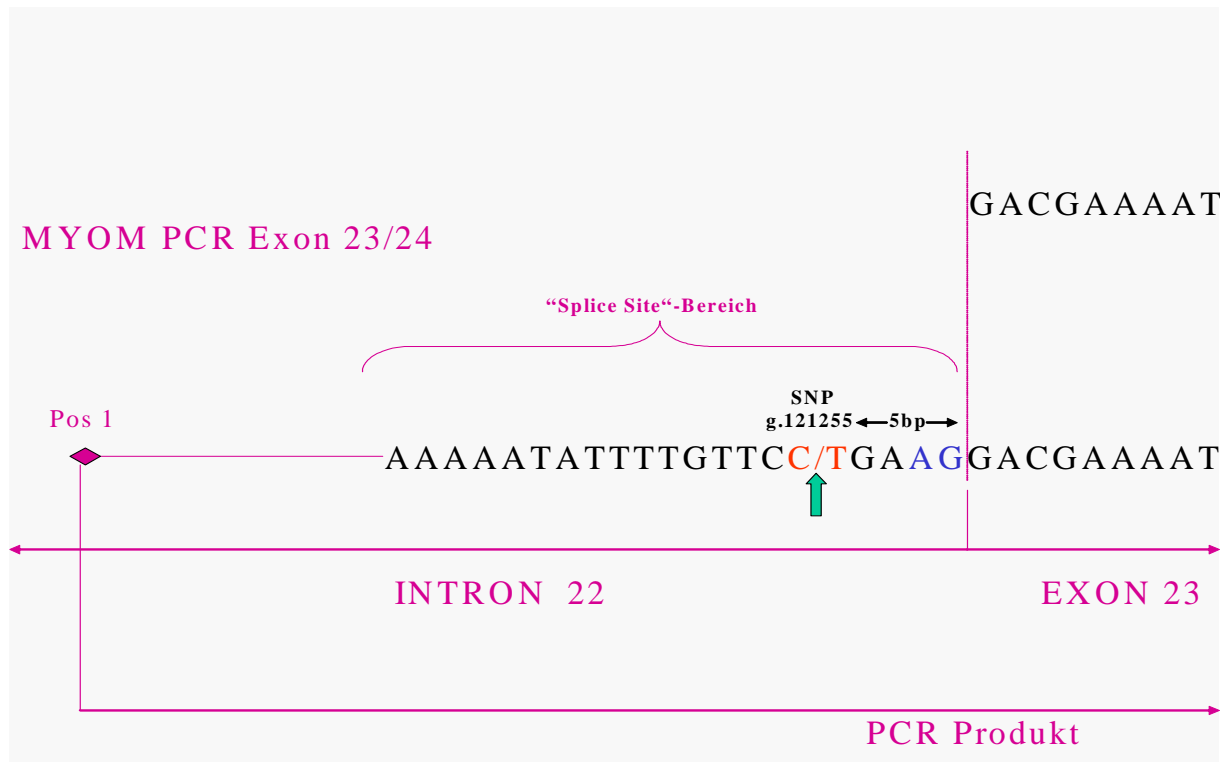


Abbildung 3.34: Darstellung des gefundenen SNP in Intron 22. Der SNP g.121255 befindet sich im "Splice Site"-Bereich, der eine wichtige Rolle beim "Alternative Splicing" spielt. "Alternative Splicing" ist ein wichtiger Mechanismus, der die genetische Expression kontrolliert und verantwortlich für die Entstehung verschiedener Protein-Isoformen ist (Erläuterung siehe Überblick 4.3.2).

3.6 Exon 25 der Myomesin Gen-Analyse

3.6.1 Polymerase-Chain-Reaction (PCR)

Das für Exon 25 entwickelte Primerpaar konnte erfolgreich optimiert werden. Das gesamte DNA-Fragment hatte eine Größe von 363 bp.

Mit Hilfe des DNA-Molekulargewichtsmarkers konnte gezeigt werden, dass das amplifizierte DNA-Fragment im erwarteten Größenbereich lag.

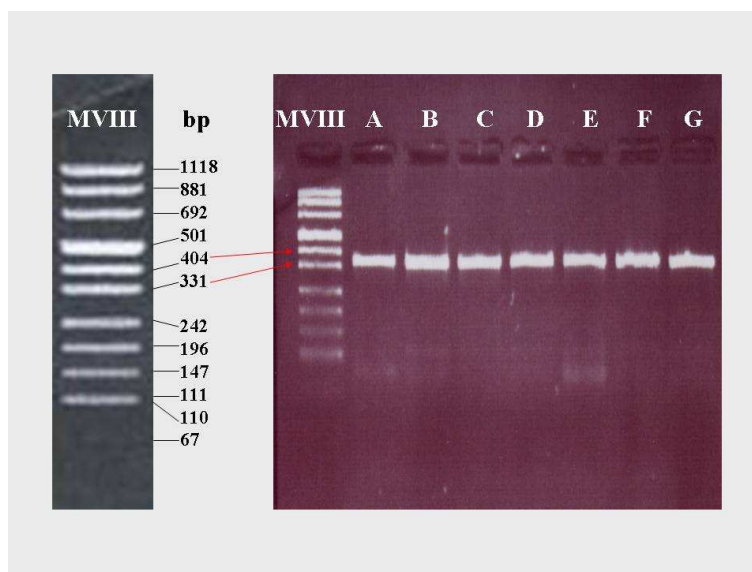


Abbildung 3.35: Optimierung der PCR. Ausschnitt eines 3%igen Agarosegels mit 363-bp PCR-Produkt des Exons 25. A-G: Probanden-DNA; MVIII: Molekulargewichtsmarker.

Es konnten alle DNA-Proben der 410 HCM-Patienten erfolgreich amplifiziert werden.

3.6.2 Single-Strand-Conformation-Polymorphism (SSCP)-Analyse

Nach der Amplifikation der DNA der 410 HCM-Patienten mittels PCR wurde die SSCP-Analyse durchgeführt. Für jedes Exon wurden zwei Gele entsprechend der verschiedenen SSCP-Bedingungen angefertigt.

Die Optimierung der SSCP ergab die folgenden zwei Bedingungen:

A) 10% Polyacrylamid-Gel bei 20°C mit einer Laufzeit von 70 Minuten.

B) 10% Formamid-Gel bei 10°C mit einer Laufzeit von 50 Minuten.

SSCP-Gele des Exons 25 des Myomesin-Gens

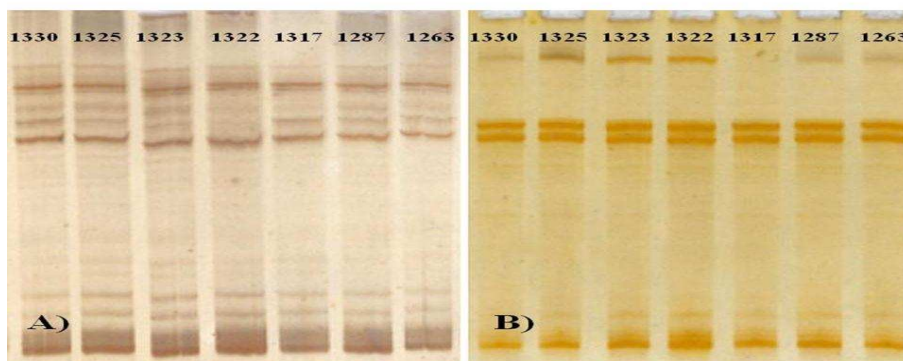


Abbildung 3.36: SSCP-Gele des Exons 25 des Myomesin-Gens. A) 10% Polyacrylamid-Gel bei 20°C mit einer Laufzeit von 70 Minuten. B) 10% Formamid bei 10°C mit einer Laufzeit von 50 Minuten.

Die SSCP-Analyse des Exons 25 zeigt ein sehr homogenes SSCP-Bandenmuster. Keine der 410 untersuchten DNA-Proben zeigte eine Auffälligkeit. Trotzdem wurden als Kontrolle 10 Proben (1016, 1464, 1471, 2238, 2252, 2254, 2256, 2257, 2258, 2259) für die Sequenzierung ausgewählt.

3.6.3 Sequenzierung

Zehn ausgewählte DNA-Proben wurden sequenziert. Keine der ausgewählten Proben zeigte Auffälligkeiten in der SSCP-Analyse. Die Sequenz-Analyse bestätigte die Ergebnisse der SSCP-Analyse, da kein Sequenzunterschied auftrat. Die sequenzierten Proben des Exons 25 hatten die gleiche Sequenz wie die Konsens-Sequenz (GenBank Nummer NT_010859). Aus Platzgründen wird die Nukleotid-Sequenz des Exons 25 nicht gezeigt.

SSCP des Exons 25 des Myomesin Gens: Sequenzierte Proben

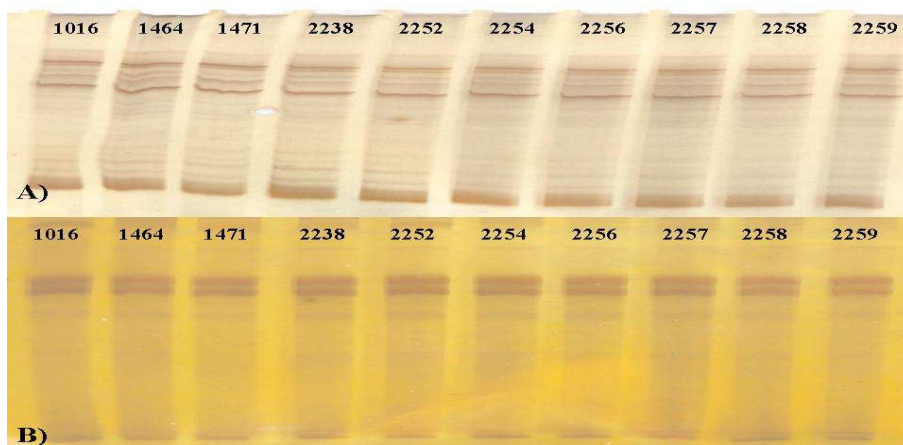


Abbildung 3.37: Darstellung der SSCP-Gele der sequenzierten Proben des Exons 25 des *MYOM*-Gens. Die SSCP-Analyse zeigt ein homogenes Muster in allen Proben. Die Ergebnisse der SSCP-Analyse bestätigen die Ergebnisse der Sequenzierung. Es trat in keiner der Proben ein Nukleotid-Sequenzunterschied auf.

3.7 Exon 26 der Myomesin Gen-Analyse

3.7.1 Polymerase-Chain-Reaction (PCR)

Das für Exon 26 entwickelte Primerpaar konnte erfolgreich optimiert werden. Das gesamte DNA-Fragment hatte eine Größe von 296 bp.

Mit Hilfe des DNA-Molekulargewichtsmarkers konnte gezeigt werden, dass das amplifizierte DNA-Fragment im erwarteten Größenbereich lag.

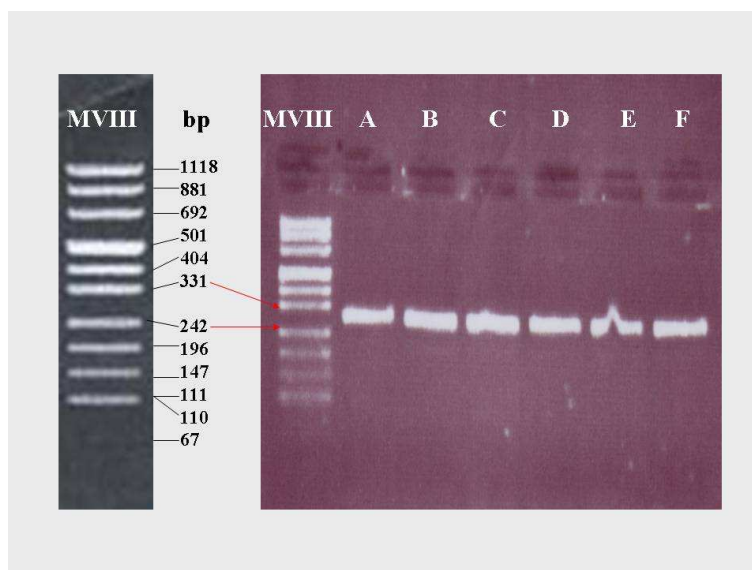


Abbildung 3.38: Optimierung der PCR. Ausschnitt eines 3%igen Agarosegels mit 296-bp PCR-Produkt des Exons 26. A-F: Probanden-DNA; MVIII: Molekulargewichtsmarker.

Es konnten alle DNA-Proben der 410 HCM-Patienten erfolgreich amplifiziert werden.

3.7.2 Single-Strand-Conformation-Polymorphism (SSCP)-Analyse

Nach der Amplifikation der DNA der 410 HCM-Patienten mittels PCR wurde die SSCP-Analyse durchgeführt. Für jedes Exon wurden zwei Gele entsprechend der verschiedenen SSCP-Bedingungen angefertigt.

Die Optimierung der SSCP ergab die folgenden zwei Bedingungen:

- A) 10% Polyacrylamid-Gel bei 15°C mit einer Laufzeit von 70 Minuten.
- B) 10% Formamid-Gel bei 10°C mit einer Laufzeit von 50 Minuten.

SSCP-Gele des Exons 26 des Myomesin-Gens

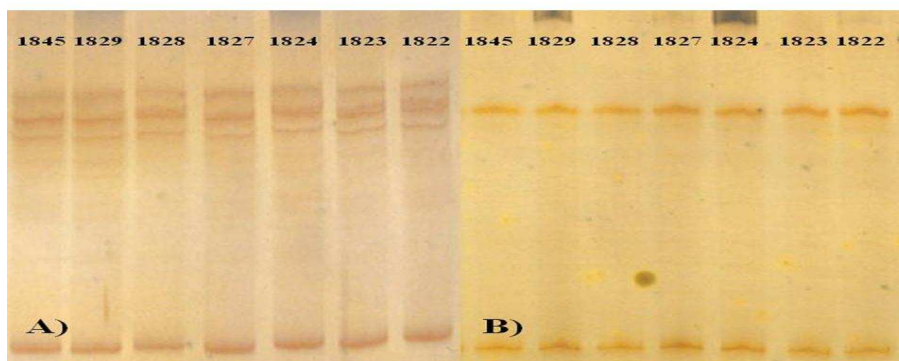


Abbildung 3.39: SSCP des Exons 26 des *MYOM*-Gens. A) 10% Polyacrylamid-Gel bei 15°C mit einer Laufzeit von 70 Minuten. B) 10% Formamid bei 10°C mit einer Laufzeit von 50 Minuten.

Die SSCP-Analyse des Exons 26 zeigte ein sehr homogenes Muster. Keine der 410 untersuchten DNA-Proben zeigte eine Auffälligkeit. Trotzdem wurden als Kontrolle 8 Proben (1136, 1425, 1804, 1807, 1859, 1862, 1866, 1869) für die Sequenzierung ausgewählt.

3.7.3 Sequenzierung

Acht ausgewählte DNA-Proben wurden sequenziert. Keine der ausgewählten Proben zeigte Auffälligkeiten in der SSCP-Analyse. Die Sequenz-Analyse hatte die Ergebnisse der SSCP-Analyse bestätigt, da kein Sequenzunterschied auftrat. Die sequenzierten Proben des Exons 26 hatten die gleiche Sequenz wie die Referenzsequenz (GenBank Nummer NT_010859). Aus Platzgründen wird die Nukleotid-Sequenz des Exons 26 nicht gezeigt.

SSCP des Exons 26 des Myomesin Gens: Sequenzierte Proben

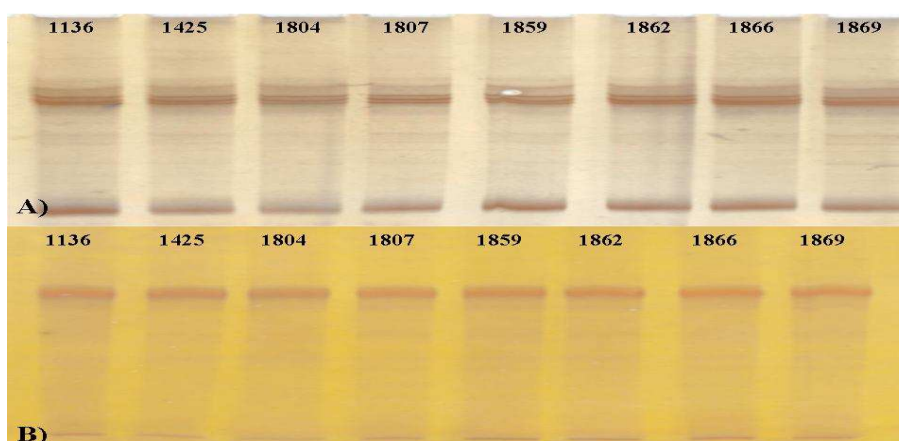


Abbildung 3.40: Darstellung der SSCP-Gele der sequenzierten Proben des Exons 26 des *MYOM*-Gens. Die SSCP-Analyse zeigte ein homogenes Muster in allen Proben. Die Ergebnisse der SSCP-Analyse bestätigen die Ergebnisse der Sequenzierung. Es trat in keiner der Proben ein Nukleotid-Sequenzunterschied auf.

4. Diskussion

Zusammenfassung der Ergebnisse

Der Ansatz dieser Untersuchung bestand darin, das Kollektiv der HCM-Patienten nach Mutationen im Kandidatengen Myomesin zu screenen. In einem Kollektiv von 410 unverwandten HCM-Patienten wurden acht *MYOM*-Exons (7, 8, 9, 22, 23, 24, 25 und 26) untersucht. Es wurden vier SNPs (g.47309 C>A, g.47317 G>T, g.47355 G>A und c.1480 C>T (Codon 382)) und eine Missense-Mutation (c.1502 C>T (Codon 390)) im Bereich des PCR-Produktes des Exons 7 identifiziert (siehe Tabelle 3.1.). Zwei SNPs (g.56910 T>C und c.1726 G>A) sowie eine Missense-Mutation (c.1724 C>T (Codon 464)) wurden im Bereich des PCR-Produktes des Exons 9 identifiziert (siehe Tabelle 3.5). Ein weiterer SNP wurde im Bereich der "Splice Site" des Exons 23 (g.121255 C>T) entdeckt (siehe Tabelle 3.6).

	Intronischer Bereich	Exonischer Bereich	
	SNP	SNP	Missense-Mutation
Exon 7	Intron 6: g.47309; g.47317; g.47355*	c.1480 (Codon 382)	c.1502 (Codon 390)
Exon 8	-	-	-
Exon 9	Intron 8: g.56910*	c.1726 (Codon 464)	c.1724 (Codon 464)
Exon 22	-	-	-
Exon 23/24	Intron 22: g.121255*	-	-
Exon 25	-	-	-
Exon 26	-	-	-

Tabelle 4.1: In der Untersuchung gefundene SNPs und Mutationen. Die mit einem Stern versehenen SNPs wurden im "Splice-Site"-Bereich lokalisiert (siehe Erläuterung im Text 3.1.8, Text 3.3.3.1 und Text 3.5.3).

4.1 HCM-Kollektiv und Methoden

Das Kollektiv umfasste 410 Patienten mit HCM. Die Patienten wiesen typische Kennzeichen der HCM auf, waren nicht miteinander verwandt und die Diagnose der HCM war klinisch gesichert. Die Diagnose der HCM basierte auf den Empfehlungen der WHO. Hauptkriterien sind dabei ein verdicktes Interventrikularseptum (> 13 mm) in Abwesenheit anderer potentieller Hypertrophiegründe (z.B. Hypertonie, Arteriosklerose etc) sowie EKG-Veränderungen wie negative T-Wellen, pathologische Q-Wellen oder Schenkelblöcke. Bei allen registrierten Patienten dieser Untersuchung bezog die Hypertrophie das Interventrikularseptum sowie bei einigen auch die Ventrikelwand mit ein.

Die in dieser Untersuchung verwendete PCR-SSCP-Methode ist als zuverlässige und sensible Methode zur Detektion unbekannter Mutationen in ausgewählten DNA-Fragmenten anerkannt und gut etabliert (Grompe M, 1993; Orita *et al.*, 1989). Die SSCP-Analyse gehört zur Gruppe

der unspezifischen Detektionsverfahren von Sequenzvariationen. Sie ist für das Screening einer größeren Probenzahl gut geeignet. Sie gibt keine Auskunft über die Art des Sequenzunterschiedes, sondern dient der Eingrenzung derjenigen Proben, die mit einer spezifischen Analyse (z.B. Sequenzierung) weiter untersucht werden müssen (Nataraj *et al.*, 1999). Aufgrund der großen Probenanzahl bei dieser Untersuchung war die PCR-SSCP-Methode die Methode der Wahl.

Die Sensitivität der SSCP für Mutationen liegt bei ca. 80-90%, wenn die Fragmentlänge der vorher amplifizierten DNA-Fragmente nicht mehr als 400 bp beträgt. Bei einer Fragmentlänge zwischen 150-200 bp lag die Sensitivität von entdeckten Mutationen in mehreren Studien zwischen 90-95% (Fan *et al.*, 1993; Glavac *et al.*, 1993; Hayashi *et al.*, 1993; Sheffield *et al.*, 1993; Ravnik-Glavac *et al.*, 1994) und sank bei einer Fragmentlänge von < 135 bp auf 78% (Sheffield *et al.*, 1993). Die zu amplifizierenden DNA-Fragmente dieser Untersuchung umfassten jeweils 247, 335, 310, 270, 441, 327 und 260 bp, was bedeutet, dass die Sensitivität der Ergebnisse bei ca. 80-90% liegen sollte.

Um die Sensitivität noch zu steigern, wurden beim Screening für jedes Exon jeweils zwei unterschiedliche Laufbedingungen gewählt, die sich in Temperatur, Laufzeit und Zusammensetzung des Gels unterschieden.

Die SSCP-Ergebnisse entsprachen in dieser Untersuchung den Ergebnissen der Sequenzierung. Es wurde bei jedem unterschiedlichen SSCP-Bandenmuster ein Nukleotidbasenaustausch in der DNA-Sequenzierung gefunden. Dies bestätigt die hohe Sensitivität der angewandten SSCP-Methode für die Mutationsdetektion.

Wenn auffällige Bandenmuster in der SSCP auftraten, wurden die DNA-Fragmente der entsprechenden Patienten in einer automatischen Sequenzierung auf Mutationen hin untersucht. Da die Amplifikation der Taq-Polymerase eine gewisse Fehlerquote aufweist (2×10^{-4} pro Zyklus und Nukleotid (Saiki *et al.*, 1988)), besteht zumindest theoretisch die Gefahr, dass ein gefundener Sequenzunterschied "künstlich" durch einen Fehleinbau der Taq-Polymerase entstanden ist. Um das Risiko einer "künstlichen" Mutation weiter zu reduzieren und somit die Sensitivität zu steigern, wurde vor jeder Sequenzierung eine neue PCR mit genomischer DNA durchgeführt und nicht alte PCR-Produkte reamplifiziert. Wenn die Sequenzierung des von der ersten Probe unabhängigen zweiten PCR-Produktes erneut einen Hinweis auf eine Mutation bot, konnte tatsächlich von einer Mutation ausgegangen werden. So konnte eine Eliminierung der Fehlerquote der Taq-Polymerase erreicht werden.

Nicht nur die Zuverlässigkeit der etablierten PCR-SSCP-Methode, sondern auch die in der Untersuchung getroffenen Maßnahmen (erneute DNA-Amplifizierungen vor der DNA-Sequenzierung zur Eliminierung der Taq-Polymerasen-Fehlerquote, Verwendung von zwei unterschiedlichen Laufbedingungen für jedes Exon bei der SSCP und Verwendung von DNA-

Fragmenten, die bis auf eine Ausnahme nicht mehr als 400 bp umfassten) steigerten die ohnehin hohe Sensitivität und die Verlässlichkeit der Ergebnisse.

4.2 Warum Myomesin als mögliche Ursache der HCM ?

Es gibt verschiedene Gründe, warum das Myomesin-Gen ein wichtiger Kandidat für die Ursache der Entstehung der HCM sein könnte und somit das Screening eines grossen Kollektivs von HCM-Patienten rechtfertigt:

- Bis jetzt wurden Mutationen in 11 für Sarkomer-Proteine kodierenden Genen beschrieben, die HCM verursachen. Myomesin ist ebenfalls ein wichtiges Sarkomer-Protein, das sich in der sarkomerischen M-Bande befindet.
- Myomesin ist ein essentieller Bestandteil der sarkomerischen M-Bande. Es ist bekannt, dass Myomesin die dominierende M-Banden-Komponente ist. Die absolute Menge an Myomesin (alle Isoformen) ist in allen Muskeltypen konstant (siehe Abbildung 1.9). Es wird vermutet, dass die Gesamtmenge von Myomesin proportional zur Menge von β -myosin heavy chain (β -MHC) im Sarkomer ist (Agarkova *et al.*, 2003). Obwohl die M-Bande eine noch nicht gut bekannte Struktur ist, weiß man um die Wichtigkeit dieser Struktur für die Funktion und Stabilität des Sarkomers. Die M-Bande ist für die korrekte Ausrichtung der dicken Filamente verantwortlich (Luther *et al.*, 1981). Die M-Banden-Filamente sorgen für die genaue Anordnung der dicken Myosinfilamente während der Kontraktion des Sarkomers und verhindern die Deformation dieser angeordneten Filament-Gitter während der Entspannung des Sarkomers. Dies ermöglicht den optimalen und konstanten Abstand zwischen dicken und dünnen Filamenten zu Beginn der Kontraktion (Millman *et al.*, 1998; Agarkova *et al.*, 2003). Die M-Bande spielt zudem eine wichtige organisatorische Rolle im Verlauf der Myofibrillogenese, wenn sich die im Aufbau befindlichen dicken Filamente zusammen mit den Titin-Filamenten in ein hexagonales Gitter integrieren (Wang *et al.*, 1998; Ehler *et al.*, 1999; Yang *et al.*, 2000).
- Myomesin hat eine ähnliche Struktur und Eigenschaften wie Titin, dessen Mutationen bekanntermaßen Ursache der HCM und DCM sind. Titin hat eine essentielle Funktion für die Elastizität des Sarkomers. Ähnlich wie Myomesin besteht Titin aus Immunoglobulin- (Ig) und Fibronectin type III (FNIII) -Domänen. Titin besitzt eine PEVK-Domäne, die der EH-Domäne von Myomesin ähnelt. Neuere Arbeiten haben gezeigt, dass Myomesin analog zu Titin wichtig für die Elastizität des Sarkomers ist und dass nicht Titin allein für diese Elastizität verantwortlich ist (Bertoncini *et al.*, 2005).

- Veröffentlichte genetische Daten zeigen, dass bislang bekannte Mutationen in Sarkomer-Proteinen für nur ca. 60% der Krankheitsfälle verantwortlich sind (Marian und Roberts, 2001; Seidman *et al.*, 2001; Franz *et al.*, 2001 and. Richard *et al.*, 2003). Diese Daten suggerieren die Existenz anderer bisher unbekannter Gene, die verantwortlich sein könnten.

4.3 Beurteilung der Ergebnisse

4.3.1 Identifikation der Mutation Leu390Phe im *MYOM*-Gen

In dieser Untersuchung wurde eine heterozygote Missense-Mutation in Codon 390 des *MYOM*-Gens identifiziert. Die betreffende Mutation wurde bei einem der 410 nicht miteinander verwandten HCM-Patienten gefunden. Der Patient mit der Leu390Phe-Mutation zeigte keine weiteren Mutationen in den bekannten HCM-Krankheitsgenen. Die SSCP-Analysen der kodierenden Gene für die β -myosin heavy chain (β -MHC), myosin binding protein C (MyBP-C), cardiac troponin T (TnT), cardiac troponin I (TnI), essential und regulatory light chains (ELC und RLC), muscle LIM protein (MLP) und α -actin (ACTC) zeigten keine Auffälligkeiten. Eine der bisher bekannten genetischen Ursachen für die Ausbildung der HCM ließ sich bei diesem Patienten also nicht nachweisen.

Auch in der Kontrolluntersuchung von 307 Proben unauffälliger Probanden ließ sich die Mutation Leu390Phe nicht nachweisen (siehe Text 3.1.7), so dass davon ausgegangen werden kann, dass die Mutation in der Normalbevölkerung nicht vorkommt und somit keinen Polymorphismus darstellt.

4.3.1.1 Mutation Leu390Phe in Familie S

In der Studie ließ sich die Mutation Leu390Phe bei vier Mitgliedern (drei Männern und einer Frau) der türkischen Immigrantenfamilie S. nachweisen. Zwei dieser von der Mutation betroffenen Familienmitglieder (IV-III und IV-V) weisen eindeutig Symptome der HCM auf.

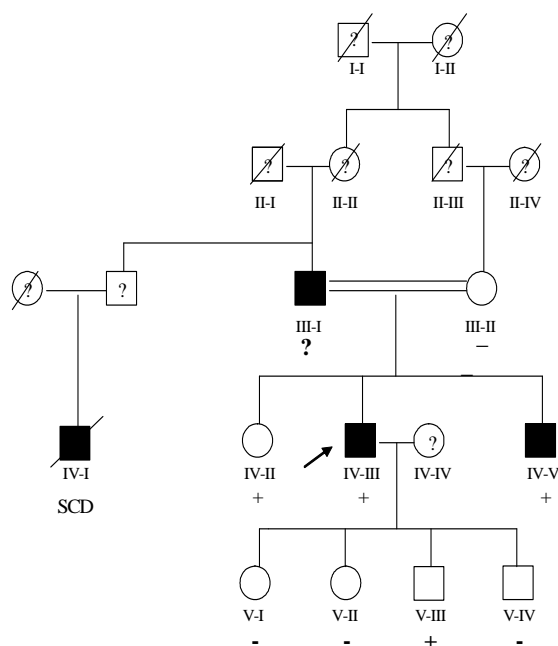


Abbildung 4.1: Stammbaum der türkischen Familie S. Quadrate zeigen Männer, Kreise zeigen Frauen. Weiß: unbetroffene Probanden; schwarz: betroffene Probanden; Pluszeichen repräsentieren die Existenz der Leu390Phe-Mutation im *MYOM*-Gen; Minuszeichen repräsentieren die Abwesenheit der Leu390Phe Mutation im *MYOM*-Gen. Der Pfeil zeigt den Index-Patienten; SCD=PHT: sudden cardiac death oder plötzlicher Herztod. Geburtsjahre der Probanden: III-I, (1943); III-II (1937); IV-I, (1951); IV-II (1966); IV-III (1961); IV-V (1972); V-I, (1987); V-II, (1989); V-III, (1992); V-IV, (1998).

Beim älteren der beiden Brüder (Index-Patient IV-III) wurde die Krankheit im Alter von 20 Jahren nach dem Auftreten einer Synkope diagnostiziert. Der Patient wies damals schon die typischen klinischen Symptome für das Vorliegen einer HCM auf. Die Beobachtung des Krankheitsverlaufs in den folgenden 13 Jahren zeigte eine klare Zustandsverschlechterung des Patienten, sowohl die klinischen Symptome als auch die objektiven Messdaten (z.B. Dicke des IVS, siehe Tabelle 3.3) betreffend. In vergangenen Arbeiten unseres Labors wurde die DNA des Index-Patienten bereits einem Screening nach Mutationen in 8 HCM-Genen unterzogen. Es wurden dabei keine genetischen Mutationen gefunden, die das Auftreten der Krankheit erklärbar machen. Dies legt nahe, dass mit hoher Wahrscheinlichkeit die Mutation Leu390Phe im *MYOM*-Gen ursächlich für das Auftreten der HCM bei diesem Patienten ist.

Beim jüngeren der beiden Brüder (IV-V) wurde die Krankheit erst in der laufenden Studie aufgrund eines pathologischen EKGs und einer echokardiographisch festgestellten Verdickung des IVS (14 mm) diagnostiziert (siehe Tabelle 3.4). Abgesehen von rascher

Ermüdung bei körperlicher Belastung wies der Proband bis dato keine klinischen Symptome auf.

Die bekannte inkomplette Penetranz der HCM zeigt sich in dem Umstand, dass bei den beiden anderen Familienmitgliedern, die die Mutation aufweisen, bisher noch keine Krankheitssymptome aufgetreten sind. Es handelt sich dabei u.a. um eine momentan 40jährige Schwester (IV-II) des Index-Patienten. Die HCM wird autosomal dominant vererbt, so dass jede von der Mutation betroffene Person auch Symptome der Krankheit aufweisen müsste. Obwohl die HCM eine primär genetische Krankheit ist, existieren gleichwohl andere Faktoren, die die Prognose oder gar das Auftreten der Krankheit beeinflussen. Die Variabilität des Phänotyps kann teilweise durch die Rolle, die die mutierten Proteine im Sarkomer spielen, und die Effekte, die sie auf die Struktur und Funktion des Sarkomers haben, erklärt werden. Andere Faktoren können die Effekte von mutierten Proteinen modifizieren. Dies würde zur Änderungen der morphologischen und pathophysiologischen Charakteristika der HCM führen. Die erste Studie über die Phänotypisierung von Individuen verschiedener Bevölkerungen hat bewiesen, dass Individuen mit der gleichen Mutation, sogar innerhalb einer Familie, große Unterschiede im Bezug auf den Phänotyp aufweisen können (Fanapazir *et al.*, 1994). Dies bedeutet, dass nicht nur eine Mutation den Phänotyp bestimmen kann, sondern dass es weitere Faktoren gibt, die die Effekte von mutierten Proteinen modifizieren können. Diese Faktoren sind unter anderem genetische, Umwelt-, geschlechtspezifische und erworbene Faktoren. Dies ist der Grund, warum oftmals die Schlussfolgerung, dass das Auftreten der Mutation gleichbedeutend mit dem Auftreten der Krankheit ist, nicht zutreffend ist. In Anbetracht der multifaktoriellen Genese der Krankheit ist es möglich, dass in dem speziellen Fall der Familie S. das Geschlecht eine wichtige Rolle für das Auftreten bzw. die Prognose derselben spielt. Die Tatsache, dass die Krankheit bei Personen männlichen Geschlechts häufiger auftritt und dort schwerere Verläufe nimmt, könnte erklären, warum die Probandin IV-II, die die Mutation Leu390Phe aufweist, nicht von der Krankheit betroffen ist. Es ließe sich sogar spekulieren, dass bei Frauen mit der Mutation Leu390Phe die Krankheit erst im höheren Lebensalter auftritt und die Probandin IV-II aus diesem Grund noch keine Krankheitssymptome aufweist. Um diese Vermutung zu bestätigen, wäre es nötig, den Krankheitsverlauf bei dieser Probandin weiter zu verfolgen.

Das vierte Familienmitglied, das die Mutation Leu390Phe aufweist, ist der 13-jährige Sohn (V-III) des Index-Patienten. Obwohl der Proband bislang noch keine Krankheitssymptome im eigentlichen Sinn aufweist, berichtet er anamnestisch über subjektiv verspürtes Herzstolpern. Dies stellt allerdings kein objektives Korrelat im Sinne einer Herzrhythmusstörung dar. Das aktuelle EKG und die echokardiographische Untersuchung ergaben keinen Hinweis für das Vorliegen einer HCM. Aufgrund des geringen Lebensalters des Probanden kann das Auftreten der Krankheit in der Zukunft aber nicht ausgeschlossen werden. Der Proband sollte

regelmäßigen Untersuchungen unterzogen werden, um den Stellenwert der betreffenden Mutation für das Auftreten und/oder die Prognose der HCM weiter zu erforschen.

Die Analyse der Genotyp-Phänotyp-Korrelation bei dieser Familie weist nach der klinischen Untersuchung der Probanden IV-III und IV-V (siehe Text 3.1.6) darauf hin, dass die beschriebene Mutation eine mildere Verlaufsform der HCM verursachen könnte. Bei jedoch nur zwei Mitgliedern dieser Familie, bei denen diese Korrelation zutrifft, kann eine definitive Aussage zur Richtigkeit dieser These nicht getroffen werden.

4.3.1.2 Stellenwert der Mutation Leu390Phe

Die Mutation Leu390Phe verursacht den Austausch von zwei Aminosäuren mit verschiedenen Eigenschaften.

Bei der heterozygoten Missense Mutation Leu390Phe wird die erste Base des Codons 390 ausgetauscht ($CTC > TTC$). Dieser Basenaustausch verursacht den Aminosäureaustausch Leucin gegen Phenylalanin, welche zwei Aminosäuren mit verschiedenen Eigenschaften sind, da es sich um eine aliphatische und um eine aromatische Aminosäure handelt (siehe Abbildung 3.8.). Die Aminosäuren-Eigenschaften sind für die Ausbildung der Tertiärstruktur der Proteine maßgeblich. Aus diesem Grund beeinflusst eine Mutation, die den Austausch von zwei Aminosäuren mit verschiedenen Eigenschaften verursacht, die Tertiärstruktur eines Proteins und dadurch seine Funktion.

Die Leu390Phe-Mutation ist in einer hoch konservierten Region der Evolutionsgeschichte lokalisiert.

Die Leu390Phe-Mutation wurde innerhalb einer hoch konservierten Region des *MYOM*-Gens in der Evolutionsgeschichte identifiziert. Dies wird durch die Tatsache verdeutlicht, dass die Aminosäure Leucin Bestandteil vieler von bei Säugetieren vorkommenden Proteinen ist (siehe Tabelle 3.2). Da die Aminosäure Leucin im Verlauf der Evolution stark konserviert wurde, bedeutet dies, dass diese Region wichtig für die Funktion des Proteins ist und dass ein Aminosäureaustausch Veränderungen der Tertiärstruktur der Proteine nach sich ziehen kann. Dies kann für die Entstehung genetischer Krankheiten verantwortlich sein.

Die Leu390Phe-Mutation befindet sich in einem Exon, das eine wichtige Domäne für die Funktion des Myomesin-Proteins kodiert.

Das Exon (Exon 7), in dem sich die Mutation Leu390Phe befindet, kodiert Teile der zweiten *MYOM*-Domäne (*MYOM 2*), einer Immunoglobulin-like Domäne, die wichtig für den exakten Einbau von Myomesin in die M-Bande während der Myofibrillogenese ist. Die Affinität der N-terminalen Domäne 1 (*MYOM 1*), sich an Myosin zu binden und den Einbau in die M-Bande zu gewährleisten, ist "in vivo" nicht ausreichend, so dass die zweite Domäne des Myomesin-Proteins für diesen Einbau mit benötigt wird (Auerbach *et al.*, 1999).

Diese drei Punkte verdeutlichen, dass die Mutation Leu390Phe eine genetische Krankheit wie die HCM verursachen könnte. Die Tatsache, dass ein Austausch von zwei Aminosäuren mit unterschiedlichen Eigenschaften stattfindet, legt den Schluss nahe, dass die Tertiärstruktur des betroffenen Proteins und somit die Funktion desselben verändert wird. Die Tatsache, dass die betroffene Aminosäure in der Evolutionsgeschichte stark konserviert wurde, spricht für deren Wichtigkeit die korrekte Funktionsfähigkeit des Proteins betreffend. Zusammen mit der Tatsache, dass die Mutation in einer Region lokalisiert ist, die eine wichtige Rolle für den korrekten Einbau der M-Bande während der Myofibrillogenese spielt, bieten sich genügend Argumente für die Annahme, dass die Mutation Leu390Phe die HCM verursacht.

Unterstützt wird diese Annahme von der Tatsache, dass bei unserem Index-Patienten (IV-III) ansonsten keine der anderen bekanntermaßen HCM-auslösenden Mutationen identifiziert wurde. Dies spricht dafür, dass in diesem Fall mit hoher Wahrscheinlichkeit die Mutation Leu390Phe das Auftreten der HCM verursacht hat.

4.3.2 SNPs im Intron- und “Splice-Site“-Bereich

Splicing (Überblick)

“Alternative Splicing“ ist ein wichtiger Mechanismus, der die genetische Expression kontrolliert und verantwortlich für die Entstehung verschiedener Protein-Isoformen ist.

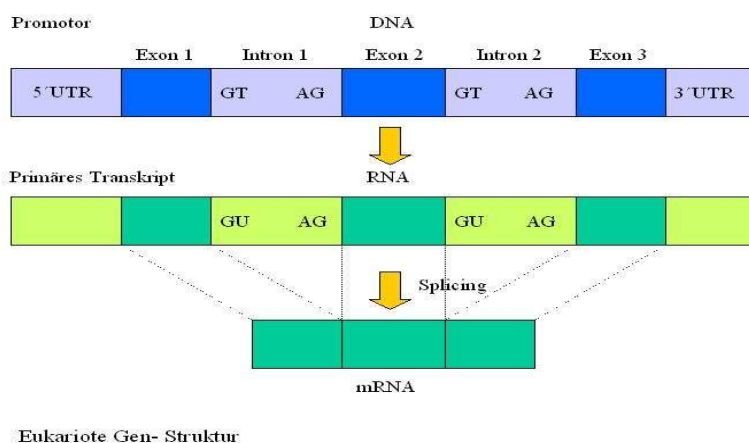


Abbildung 4.2: Darstellung der Struktur eukaryotischer Gene und Splicing-Prozesse. Die Exons und Introns werden in 5'-3'-Richtung des kodierenden Strangs nummeriert. Das Splicing muss äußerst präzise vonstatten gehen, um ungewollte Veränderungen im Leseraster zu vermeiden. Introns beginnen immer mit den Nukleotiden GT im 5'-3'-Strang (GU in der RNA) und enden mit AG. Die mit GT beginnende Sequenz am 5'-Ende des Introns nennt man Splice-Donorstelle. Das 3'-Ende, das mit AG endet, nennt man Splice-Akzeptorstelle.

Eukaryote Gene bestehen aus kodierenden und nicht kodierenden DNA-Segmenten, den Exons und den Introns. Bei der DNA-Replikation werden sowohl Exons als auch Introns in

eine Vorläufer-RNA (primäre RNA) transkribiert. Das erste und letzte Exon enthalten üblicherweise Sequenzen, die nicht für die Translation vorgesehen sind. Sie werden als 5`untranslated-region (5`UTR) in Exon 1 und 3`UTR am 3`-Ende des letzten Exons bezeichnet. Die nicht kodierenden Abschnitte (Introns) werden aus dem primären Transkript entfernt und die Exons an beiden Seiten miteinander verbunden. Dieser Prozess nennt sich Splicing und wird durch das Spliceosom³ vermittelt.

Die "Splice Site" besteht aus verschiedenen Stellen, die nicht variabel sind. Dies sind die GU- und AG-Nukleotide am Ende des Introns (jeweils Splice-Donorstelle und Splice-Akzeptorstelle) und die Adenin-Base, die als "Branchpoint" dient. Die Nukleotide des Polymiridin-Teiles (Y)_n können variieren, die Grundstruktur bleibt jedoch erhalten (siehe Abbildung 4.3). Die Wichtigkeit von korrektem Splicing zeigt sich in der Tatsache, dass mindestens 15%, unter Umständen sogar mehr als 50% der genetischen Erkrankungen aus Mutationen der "Splice Site" entstehen (Matlin *et al.*, 2005).

Aus diesem Grund können Mutationen bzw. SNPs im unkodierenden intronischen Bereich der "Splice Site" als Ursache für die Entstehung verschiedener genetisch bedingter Krankheiten verantwortlich gemacht werden.

Die nächste Abbildung stellt die typische Grundstruktur der "Splice Site" dar:

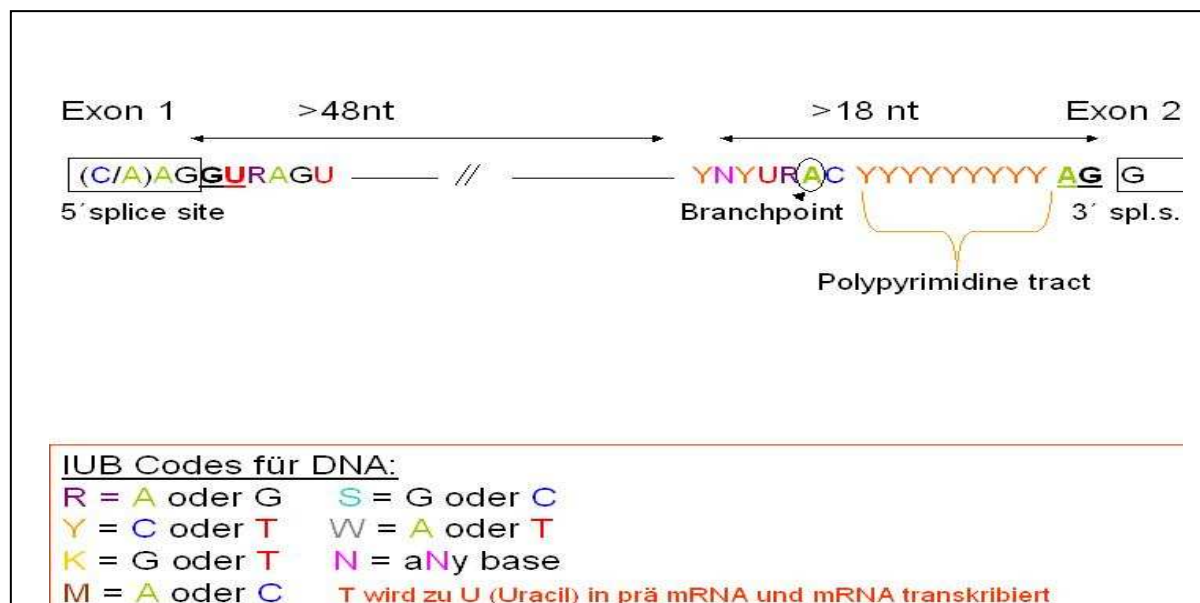


Abbildung 4.3: Darstellung der "Splice Site" in eukaryonten Genen (pre mRNA). Die Dinukleotide GU und AG am Ende des Introns und die Adenin-Base, die als "Branchpoint" dient, bleiben unvariabel. Der Polypyrimidinteil wird immer konserviert, kann jedoch verschiedene Kombinationen unter Verwendung der Basen Cytosin und Uracil aufweisen.

³ RNA enthaltendes Protein, das aus fünf Arten kleiner nukleärer RNA-Moleküle (snRNA) und mehr als 50 Proteinen (kleine nukleäre Riboprotein-Partikel) besteht.

SNPs im Intron- und “Splice-Site“-Bereich

In dieser Studie wurden insgesamt fünf SNPs im intronischen Bereich des *MYOM*-Gens gefunden (Intron 6: g.47309, g.47317, g.47355; Intron 8: g.56910; Intron 22: g.121255).

Die SNPs g.47355, g.56910 und g.121255 könnten sich gemäß des angegebenen Beispiels für die Grundstruktur der “Splice Site“ (siehe Abbildung 4.3) innerhalb des “Splice Site“-Bereichs befinden. Der SNP g.47355 liegt nur 19 bp vom Anfang des Exons 7 entfernt, der SNP g.56910 26 bp vom Anfang des Exons 9 und der SNP g.121255 5 bp vom Anfang des Exons 23.

Intronischen Bereich	
SNP	
Exon 7	Intron 6: g.47309; g.47317; g.47355*
Exon 8	-
Exon 9	Intron 8: g.56910*
Exon 22	-
Exon 23/24	Intron 22: g.121255*
Exon 25	-
Exon 26	-

Tabelle 4.2: In dieser Untersuchung gefundene SNPs im intronischen Bereich des *MYOM*-Gens. Die mit einem Sterne markierten SNPs wurden im “Splice-Site“-Bereich lokalisiert.

Polymorphismen, die sich innerhalb des “Splice-Site“-Bereichs befinden, könnten eine anormale Funktion des “Alternative Splicing“ verursachen und somit einen Faktor für das Auftreten einer genetischen Krankheit darstellen (Cáceres und Kornblihtt, 2002; Cartegni *et al.*, 2002; Matlin *et al.*, 2005). Aus diesem Grund können Mutationen bzw. SNPs im unkodierenden intronischen Bereich der “Splice Site“ als Ursache für die Entstehung verschiedener genetisch bedingter Krankheiten verantwortlich gemacht werden. Die bei dieser Untersuchung gefundenen SNPs im Bereich der “Splice-Site“ könnten demzufolge ursächlich für das Auftreten der HCM sein. Zum endgültigen Beweis bedarf es jedoch weiterführender Analysen.

Die anderen beiden SNPs (SNP g.47309 und SNP g.47317), die im Intron 6 identifiziert wurden, haben höchstwahrscheinlich keinen Einfluss auf das “Alternative Splicing“, da sie vom Anfang des Exons 7 weit entfernt liegen.

4.3.3 SNPs und weitere Missense-Mutation im Exonbereich

Der im exonischen Bereich des Exons 7 lokalisierte SNP wurde in der Position c.1480 (Codon 382) identifiziert. Die Sequenz-Analyse ergab einen stillen homozygoten SNP. Dabei wurde die Base Cytosin gegen Thymin ausgetauscht. Dieser Basenaustausch verursacht keinen Aminosäureaustausch (His382His) (siehe Abbildung 3.6). Die Frequenz, mit der der SNP c.1480 in dieser Untersuchung auftaucht, belegt die Häufigkeit dieses Polymorphismus bei den HCM-Patienten.

	Exonischer Bereich	
	SNP	Missense-Mutation
Exon 7	c.1480 (Codon 382)	c.1502 (Codon 390)*
Exon 8	-	-
Exon 9	c.1726 (Codon 464)	c.1724 (Codon 464)
Exon 22	-	-
Exon 23/24	-	-
Exon 25	-	-
Exon 26	-	-

Tabelle 4.3: In dieser Untersuchung gefundene SNPs und Missense Mutationen im exonischen Bereich des *MYOM*-Gens. (*) Erläuterung siehe Text 4.3.1.

In Position c.1726 des *MYOM*-Gens (Codon 464) wurde ein weiterer SNP identifiziert. Bei diesem SNP war das Codon 464 betroffen. Dabei wurde die Base Guanin gegen Adenin ausgetauscht. Dieser Basenaustausch verursacht jedoch ebenfalls keinen Aminosäureaustausch (Arg464Arg).

Da sowohl der SNP c.1480 als auch der SNP c.1726 keinen Aminosäureaustausch verursachen, ist keine Veränderung der Tertiärstruktur des Myomesin-Proteins zu erwarten. Damit ist ein Einfluss dieser SNPs auf die Funktion des Proteins äußerst unwahrscheinlich.

In Position c.1724 (Codon 464) wurde eine heterozygote Mutation identifiziert, die die Aminosäure Arginin im Codon 464 betraf. Dabei wurde die Base Cytosin gegen Thymin ausgetauscht. Dieser Basenaustausch verursachte den Aminosäureaustausch Arginin gegen Tryptophan (Arg464Trp) (siehe Abbildung 3.22,D). Die Mutation Arg464Trp in Codon 464 des *MYOM*-Gens wurde bei einer HCM-unauffälligen Probandin identifiziert. Die Probandin gehört zu einer HCM-Familie, in der eine Mutation der β -myosin-heavy-chain (Arg403Trp) in vorangegangenen Arbeiten identifiziert werden konnte (Perrot *et al.* 2005).

Mit Hilfe des Restriktionsenzymverdau mit MwoI konnte die Mutation Arg464Trp noch bei zwei weiteren HCM-unauffälligen Angehörigen der HCM-Familie identifiziert werden (siehe Abbildung 3.26). Weitere Restriktionsenzymverdau-Untersuchungen mit dem

Restriktionsenzym MowI haben bei 146 unauffälligen Kontrollen die Mutation Arg464Trp nicht nachweisen können.

Es besteht eine enge Verwandtschaft zwischen den Probandinnen, die die Arg464Trp-Mutation aufweisen (Mutter und ihre zwei Töchter). Diese Probandinnen waren klinisch unauffällig. Die echokardiographische Evaluation konnte keinen pathologischen Befund nachweisen, die elektrokardiographische Untersuchung war ebenfalls unauffällig.

Da keine der Probandinnen mit der Arg464Trp-Mutation an Hypertropher Kardiomyopathie leidet und die HCM-auffälligen Patienten die Mutation nicht hatten, konnte kein Zusammenhang zwischen der identifizierten Mutation Arg464Trp und der Entstehung der Krankheit hergestellt werden.

4.4 Schlussfolgerung

Die Ergebnisse der Studie lassen den Schluss zu, dass eine Fehlfunktion des *MYOM*-Gens zur Ausbildung der HCM führen kann. Damit fügt sich das *MYOM*-Gen in die lange Liste der als Auslöser für die HCM bekannten Gene ein.

Die meisten der identifizierten Mutationen, die als Ursache für die HCM in Betracht kommen, sind Missense-Mutationen (Elliot und McKenna, 2004). In dieser Studie konnte eine Punktmutation im für die Kodierung des sarkomerischen Proteins Myomesin zuständigen *MYOM*-Gen identifiziert werden. Die Mutation Leu390Phe konnte bei vier Mitgliedern einer an HCM leidenden Familie nachgewiesen werden. Beim Index-Patienten, der die Leu390Phe-Mutation aufwies, konnte keine andere als Ursache für die HCM bekannte Mutation identifiziert werden. Diese Tatsache verbunden mit den Eigenschaften der Mutation (die Mutation Leu390Phe verursacht den Austausch von zwei Aminosäuren mit verschiedenen Eigenschaften, sie ist in einer hoch konservierten Region der Evolutionsgeschichte lokalisiert und befindet sich in einem Exon, das eine wichtige Domäne für die Funktion des Myomesin-Proteins kodiert) liefert genügend Argumente für die Annahme, dass besagte Mutation im für die Kodierung des Sarkomer-Proteins Myomesin zuständigen Gen der Auslöser für die HCM bei dieser Familie ist.

Es wurden weitere Polymorphismen, die sich im "Splice Site"-Bereich befinden, innerhalb dieser Untersuchung identifiziert. Diese könnten als Ursache für die Entstehung der HCM verantwortlich gemacht werden. Zum endgültigen Beweis bedarf es jedoch weiterführender Analysen auf RNA-Ebene.

5. Zusammenfassung

Die Hypertrophe Kardiomyopathie (HCM) ist eine primäre Herzmuskelerkrankung mit einer Prävalenz von 1:500 (Maron *et al.*, 1994 und Maron *et al.*, 1995). Bei über der Hälfte der Patienten wird eine familiäre Häufung mit meist autosomal dominantem Erbgang mit variabler Expression beobachtet. Der Phänotyp kann von asymptomatisch bis zum plötzlichen Tod (PHT) variieren. Die HCM wird durch linksventrikuläre Hypertrophie ohne sekundäre Ursachen wie Hypertonie, Arteriosklerose oder valvuläre Stenosen diagnostiziert. Sie ist charakterisiert durch eine vergrößerte Wanddicke des linken und/oder rechten Ventrikels ≥ 13 mm (McKenna *et al.*, 1997). Die HCM wird meist durch Mutationen in Sarkomer-Proteinen verursacht. Bis heute wurden mehr als 400 Mutationen in 13 Genen als Ursache für die HCM identifiziert (Elliot und McKenna, 2004; Maron *et al.*, 2006). Die meisten der identifizierten Mutationen, die als Ursache für die HCM in Betracht kommen, sind Missense-Mutationen. Der Austausch eines einzigen Nukleotids verursacht einen Aminosäureaustausch, welcher der Funktionsfähigkeit des Proteins schaden und daher die Entstehung der Krankheit verursachen kann.

Ziel dieser Studie war zu beweisen, dass das für die Kodierung des Sarkomerproteins Myomesin zuständige *MYOM*-Gen bei Fehlfunktion einen Auslöser für die HCM darstellt und sich somit in die lange Liste der HCM-verursachenden Gene einfügt.

In dieser Arbeit wurde ein Programm zur Mutationssuche im Genbereich (Exons 7, 8, 9, 22, 23, 24, 25 und 26) des Sarkomerproteins Myomesin etabliert. Als Methoden wurden die Polymerase-Chain-Reaction (PCR), Single-Strand-Conformation-Polymorphism (SSCP)-Analyse und Sequenzierung verwendet. Bei spezielleren Fragestellungen kam zusätzlich noch der Restriktionsenzymverdau zur Anwendung. Es wurden 410 nicht verwandten HCM-Patienten und 307 Kontrollen untersucht.

Es wurden vier SNPs (g.47309, g.47317, g.47355 und c.1480 (Codon 382)) und eine Missense-Mutation (c.1502 (Mutation Leu390Phe)) im Bereich des PCR-Produktes des Exons 7 des *MYOM*-Gens identifiziert. Zwei SNPs (g.56910 und c.1726) sowie eine Missense-Mutation (c.1724 (Codon 464)) wurden im Bereich des PCR-Produktes des Exons 9 identifiziert. Ein weiterer SNP wurde im Bereich der "Splice Site" des Exons 23 (g.121255) entdeckt.

Die Identifizierung der Mutation Leu390Phe zeigt, dass Mutationen im *MYOM*-Gen HCM verursachen können. Die Identifizierung verschiedener SNPs im "Splice-Site"-Bereich des *MYOM*-Gens bildet einen Ansatzpunkt für weiterführende Analysen zum Beweis des Einflusses dieser Polymorphismen auf Myomesin und seine Funktion im Sarkomer.

Außerdem hat sich gezeigt, dass eine Mutationssuche mit den verwandten Methoden möglich ist. Diese Arbeit stellt einen Beitrag zur Grundlagenforschung der HCM dar. Die zunehmende Identifizierung von HCM-assoziierten Mutationen ermöglicht eine bessere Diagnostik und genetische Beratung der Patienten und somit eine Verbesserung der Behandlungsmöglichkeit der HCM.

6. Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
A	Adenin
ACTC	<i>Cardiac actin</i>
ADP	Adenosindiphosphat
Arg	Arginin
ARVC	Arrhythmogene Rechtsventrikuläre Kardiomyopathie
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
C	Cytosin
c.	Kodierend
DCM	Dilatative Kardiomyopathie
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EKG	Elektrokardiogramm
ELC	<i>Essential light chain</i>
EMB	Endomyokardbiopsie
FA	Formamid
G	Guanin
g.	Genomisch
HCM	Hypertrophe Kardiomyopathie
His	Histidin
HOCM	Hypertrophe Obstruktive Kardiomyopathie
HPLC	Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie
IVS	Interventrikularseptum
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
KHK	Koronare Herzkrankheit
Leu	Leucin
LV	Linksventrikulär
M	Mol
MDE	<i>Mutation Detection Enhancement</i>
MgCl ₂	Magnesiumdichlorid
min	Minute
ml	Milliliter
MLP	<i>Muscle LIM protein</i>
mM	Millimol

MM-CK	Creatinkinase Isoenzym MM
mV	Millivolt
MVIII	Molekulargewichtsmarker
MVP	Mitralklappenprolaps
MyBPC	<i>Myosin binding protein C</i>
MYOM	Myomesin-Gen
NaOH	Natriumhydroxid
Ng	Nanogramm
Nr.	Nummer
PAA	Polyacrylamid
PCR	Polymerase-Kettenreaktion, <i>Polymerase-Chain-Reaction</i>
PEVK	Prolin-Glutamat-Valin-Lysin
pH	Potentia Hydrogenii
Phe	Phenylalanin
PHT	Plötzlicher Herztod
Pro	Prolin
RCM	Restriktive Kardiomyopathie
RFLP	Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus
RLC	<i>Regulatory light chain</i>
RNA	Ribonukleinsäure
SNP	Polymorphismus
SSCP	<i>Single-Strand-Conformation-Polimorphism</i>
T	Thymin
TBE	Tris-HCl-Borat-Ethylendiamintetraacetat
TEMED	Tetramethylendiamin
TnC	<i>Cardiac troponin C</i>
TnI	<i>Cardiac troponin I</i>
TnT	<i>Cardiac troponin T</i>
Trp	Tryptophan
U	Unit
WHO	World Health Organization
WT	Wild Typ
α TM	<i>α-tropomyosin</i>
β MHC	<i>β-myosin heavy chain</i>
ml	Mikroliter

7. Literaturverzeichnis

- Agarkova I, Auerbach D, Ehler E, Perriard PC: A novel marker for vertebrate embryonic heart, the EH-myomesin isoform. *J Biol Chem* 2000; 275: 10256-64.
- Agarkova I, Ehler E, Lange S, Schoenauer R, Perriard JC: M-band: a safeguard for sarcomere stability?. *J Muscle Res Cell Motil* 2003; 24: 191-203.
- Agarkova I and Perriard JC: The M-band: an elastic web that crosslinks thick filaments in the center of the sarcomere. *Trends Cell Biol* 2005; 15: 477-485.
- Arad M, Seidman JG and Seidman C: Phenotypic diversity in hypertrophic cardiomyopathy. *Hum Mol Genet* 2002; 11: 2499-506.
- Arad M, Benson DW, Pérez-Atayde AR, McKenna WJ, Sparks EA, Kanter RJ, McGarry K, Seidman GJ, Seidman CE: Constitutively active AMP kinase mutations cause glycogen storage disease mimicking hypertrophic cardiomyopathy. *J Clin Invest* 2002; 109: 357-62.
- Auerbach D, Bantle S, Keller S, Hinderling V, Leu M, Ehler E, Perriard JC: Different Domains of the M-Band Protein Myomesin Are Involved in Myosin Binding and M-Band Targeting. *Mol Biol Cell* 1999; 10: 1297-308.
- Bertoncini P, Schoenauer R, Agarkova I, Hegner M, Perriard JC, Güntherodt J: Study of the Mechanical Properties of Myomesin Proteins Using Dynamic Force Spectroscopy. *J Mol Biol* 2005; 348: 1127-37.
- Blair E, Redwood C, Ashrafian H, Oliveira M, Broxholme J, Kerr B, Salmon A, Ostman-Smith A, Ostman-Smith I, Watkins H: Mutations in the γ^2 subunit of AMP-activated protein kinase cause familial hypertrophic cardiomyopathy: evidence for the central role of energy compromise in disease pathogenesis. *Hum Mol Genet* 2001; 10: 1215-20.
- Bonne G, Carrier L, Bercovici J *et al*: Cardiac myosin binding protein-C gene splice acceptor site mutation is associated with familial hypertrophic cardiomyopathy. *Nat Genet* 1995; 11: 438-40.
- Cáceres JF, and Kornblihtt AR: Alternative splicing: multiple control mechanisms and involvement in human disease. *Trends Genet* 2002; 18: 186-93.
- Cartegni L, Chew SL, and Krainer AR: Listening to silence and understanding nonsense: exonic mutations that affect splicing. *Nat Rev Genet* 2002; 3: 285-98.
- Davies MJ: The cardiomyopathies: an overview. *Heart* 2000; 83: 469-74.

Davis JS, Hassanzadeh S, Winitsky S, Lin H, Satorius C, Vemuri R, Aletras AH, Wen H, and Epstein ND: The overall pattern of cardiac contraction depends on a spatial gradient of myosin regulatory light chain phosphorylation. *Cell* 2001; 107: 631-41.

Ehler E, Rothen BM, Hammerle SP, Komiyama M, Perriard JC: Myofibrillogenesis in the developing chicken heart: assembly of Z-disk, M-line and the thick filaments. *J Cell Sci* 1999; 112: 1529-39.

Elliott P and McKenna WJ: Hypertrophic cardiomyopathy. *Lancet* 2004; 363:1881-91.

Fan E, Levin DB, Glickman BW, Logan DM: Limitations in the use of SSCP analysis. *Mut Res* 1993; 288: 85-92.

Fananapazir L and Epstein ND: Genotype-phenotype correlations in hypertrophic cardiomyopathy. Insights provided by comparisons of kindreds with distinct and identical β -myosin heavy chain gene mutations. *Circulation* 1994; 89:22-32.

Franz WM, Muller OJ, Katus HA: Cardiomyopathies: from genetics to the prospect of treatment. *Lancet* 2001; 358; 1627-37.

Geier C, Özcelik C, Perrot A, Bit-Avragim N, Scheffold T, Osterziel KJ: Muscle LIM protein: a novel disease gene for hypertrophic cardiomyopathy? *Circulation* 2001; 104, II-21 (abst.).

Geier C, Perrot A, Özcelik C *et al*: Mutations in the Human Muscle LIM Protein Gene in Families with Hypertrophic Cardiomyopathy. *Circulation* 2003; 107: 1390-95.

Geisterfer-Lowrance AA, Kass S, Tanigawa G *et al*: A molecular basis for familial hypertrophic cardiomyopathy: a beta cardiac myosin heavy chain gene missense mutation. *Cell* 1990; 62: 999-1006.

Glavac D, Dean M: Optimization of the single-strand conformation polymorphism (SSCP) technique for detection of point mutations. *Hum Mut* 1993; 2: 404-14.

Grompe M: The rapid detection of unknown mutations in nucleic acids. *Nat Genet* 1993; 5: 111-17.

Grove BK, Kurer V, Lehner C, Doetschman TC, Perriard JC, Eppenberger HM: A new 185,000-dalton skeletal muscle protein detected by monoclonal antibodies. *J Cell Biol* 1984; 98: 518-24.

Grove BK, Cerny L, Perriard JC, Eppenberger HM: Myomesin and M-protein: expression of two M-band proteins in pectoral muscle and heart during development. *J Cell Biol* 1985; 101: 1413-21.

Grove BK, Cerny L, Perriard JC, Eppenberger HM, Thornell LE: Fiber type-specific distribution of M-band proteins in chicken muscle. *J Histochem Cytochem* 1989; 37: 447-54.

Hayashi K, Yandell DW: How sensitive is PCR-SSCP?. *Hum Mutat* 1993; 2: 338-46.

Henry WL, DeMaria A, Gramiak R *et al*: Report of the American Society of Echocardiography Committee on Nomenclature and Standards in two-dimensional echocardiography. *Circulation* 1980; 62: 212-17.

Hoffmann B, Schmidt-Traub H, Perrot A, Osterziel KJ, Gessner R: First mutation in cardiac troponin C, L29Q, in a patient with hypertrophic cardiomyopathy. *Hum Mutat* 2001; 17: 524.

Hornemann T, Kempa S, Himmel M, Hayeß K, Fürst DO, Wallmann T: Muscle-type creatine kinase interacts with central domains of the M-band proteins Myomesin and M-protein. *J Mol Biol* 2003; 322: 877-87.

Junqueira LC, Carneiro J, Kelley RO (1998) Basic Histology, 9th ed. Appleton & Lange, Stamford, Connecticut.

Karibe A, Tobacman LS, Strand J *et al*: Hypertrophic cardiomyopathy caused by a novel α -tropomyosin mutation (V95A) is associated with mild cardiac phenotype, abnormal calcium binding to troponin and myosin cycling, and a poor prognosis. *Circulation* 2001; 103: 65-71.

Kimura A, Harada H, Park JE *et al*: Mutations in the cardiac troponin I gene associated with hypertrophic cardiomyopathy. *Nat Genet* 1997; 16: 379-82.

Lahiri DK, Nurnberger JJ: A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Res* 1991; 19: 5444.

Lange S, Agarkova I, Perriard JC and Ehler E: The sarcomeric M-band during development and in disease. *J Muscle Res Cell Motil* 2005; 26: 375-9.

Lange S, Himmel M, Auerbach D, Agarkova I, Hayess K, Fürst DO, Perriard JC, and Ehler E: Dimerisation of Myomesin: Implications for the Structure of the Sarcomeric M-band. *J Mol Biol* 2005; 345:289-98.

Lipschultz SE, Sleeper LA, Towbin JA, *et al*: The incidence of pediatric cardiomyopathy in two regions of the United States. *N Engl J Med* 2003; 348: 1647-55.

Löffler G, Petrides PE (1998) Biochemie und Pathobiochemie. 6. Aufl. Springer, Berlin Heidelberg New York Tokyo.

Luther PK, Munro PM and Squire J: Three-dimensional structure of the vertebrate muscle A-band. III. M-region structure and myosin filament symmetry. *J Mol Biol* 1981; 151: 703-30.

Marian AJ and Roberts R: Molecular genetic basis of hypertrophic cardiomyopathy: genetic markers for sudden cardiac death. *J Electrophysiol* 1998; 9: 88-99.

Marian AJ and Roberts R: The molecular genetic basis for hypertrophic cardiomyopathy. *J Mol Cell Cardiol* 2001; 33: 655-70.

Marin-García J, Ananthakrishnan R, Goldenthal MJ, Filiano JJ and Pérez-Atayde A: Cardiac mitochondrial dysfunction and DNA depletion in children with hypertrophic cardiomyopathy. *J Inherit Metab Dis* 1997; 20: 674-80.

Maron BJ, Peterson EE, Maron MS, Peterson JE: Prevalence of hypertrophic cardiomyopathy in an outpatient population referred for echocardiographic study. *Am J Cardiol* 1994; 73:577-80.

Maron BJ, Gardin JM, Flack JM, Gidding SS, Kurosaki TT, Bild DE: Prevalence of hypertrophic cardiomyopathy in a general population of young adults. Echocardiographic analysis of 4111 subjects in the CARDIA Study. Coronary Artery Risk Development in (Young) Adults. *Circulation* 1995; 92:785-9.

Maron BJ, Shirani J, Poliac LC, Mathenge R, Roberts WC, Mueller FO: Sudden death in young competitive athletes. Clinical, demographic and pathological profiles. *JAMA* 1996; 276: 199-204.

Maron BJ: Hypertrophic cardiomyopathy. *Lancet* 1997; 350: 127-33.

Maron BJ, Towbin JA, Thiene G, Antzelevitch C, Corrado D, Arnett D, Moss AJ, Seidman CE, Young JB: Contemporary definitions and classification of the cardiomyopathies. *Circulation* 2006; 113:1807-16.

Matlin AJ, Clark F, and Smith CWJ: Understanding alternative splicing: towards a cellular code. *Mol Cell Biol* 2005; 6: 386-98.

McKenna WJ, Spirito P, Desnos M, Dobourg O, Komalda M: Experience from clinical genetics in hypertrophic cardiomyopathy: proposal for new diagnostic criteria in adults members of affected families. *Heart* 1997; 77: 130-132.

Millman BM: The filament lattice of striated muscle. *Physiol Rev* 1998; 78: 359-391.

Mogensen J, Klausen IC, Pedersen AK *et al*: Alpha-cardiac actin is a novel disease gene in familial hypertrophic cardiomyopathy. *J Clin Invest* 1999; 103: R39-43.

Nataraj AJ, Olivos-Glander I, Kusakawa N, Highsmith WE Jr: Single-strand conformation polymorphism and heteroduplex analysis for gel-based mutation detection. *Electrophoresis* 1999; 20: 1177-85.

Niimura H, Patton KK, McKenna WJ *et al*: Sarcomere protein gene mutations in hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation* 2002; 105:446-51.

Nugent AW, Daubeney PEF, Chondros P, *et al*: The Epidemiology of Childhood Cardiomyopathy in Australia. *N Engl J Med* 2003; 348: 1693-46.

Obermann WMJ, Gautel M, Steiner F, van der Ven PF, Weber K, and Fürst DO: The structure of the sarcomeric M-band: localization of defined domains of myomesin, M Protein, and the 250 Kd carboxy terminal region of titin by immunoelectron microscopy. *J Cell Biol* 1996; 134: 1441-53.

Obermann WMJ, Gautel M, Weber K, and Fürst DO: Molecular structure of the sarcomeric M band: mapping of titin and myosin binding domains in myomesin and the identification of a potential regulatory phosphorylation site in myomesin. *EMBO J* 1997; 16: 211-20.

Obermann WMJ, van der Ven PF, Steiner F, Weber K, and Fürst DO: Mapping of a myosin-binding domain and a regulatory phosphorylation site in M-protein, a structural protein of the sarcomeric M-band. *Mol Biol Cell* 1998; 9: 829-40.

Orita M, Iwahana H, Kanazawa H, Hayashi K, Sekiya T: Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 1766-70.

Ortlepp JR, Vosberg HP, Reith S, Ohme F, Mahon NG, Schroder D, Klues HG, Hanrath P and McKenna WJ: Genetic polymorphisms in the renin-angiotensin-aldosterone system associated with expression of left ventricular hypertrophy in hypertrophic cardiomyopathy: a study of five polymorphic genes in a family with a disease causing mutation in the myosin binding protein C gene. *Heart* 2002; 87: 270-75.

Poetter K, Jiang H, Hassanzadeh S *et al*: Mutations in either the essential or regulatory light chains of myosin are associated with a rare myopathy in human heart and skeletal muscle. *Nat Genet* 1996; 13: 63-69.

Price MG and Gomer RH: Skelemin, a cytoskeletal M-disc periphery protein, contains motifs of adhesion/recognition and intermediate filament proteins. *J Biol Chem* 1993: 21800-21810.

Ravnik-Glavac M, Glavac D, Dean M: Sensitivity of single-strand conformation polymorphism and heteroduplex method for mutation detection in the cystic fibrosis gene. *Hum Mol Genet* 1994; 3: 801-7.

Richard P, Charron P, Carrier L, *et al*: Hypertrophic cardiomyopathy: distribution of disease genes, spectrum of mutations and implications for a molecular diagnosis strategy. *Circulation* 2003; 107: 2227-32.

Richardson P, McKenna W, Briston M, Maisch B, Mautner B, O'Connell J, Olsen EGJ, Thiene G, Guyarfas I: Report of the 1995 WHO/ISFC Task Force on the definition and classification of cardiomyopathies. *Circulation* 1996; 93: 841-42.

Roberts R and Sigwart U: New concepts in hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation* 2001; 104: 2113-16, 2249-52.

Sachdev B, Takenaka T, Teraguchi H, Tei C, Lee P, McKenna WJ, and Elliott PM: Prevalence of Anderson-Fabry disease in male patients with late onset hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation* 2002; 105: 1407-11.

Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Hom GT, Mullis KB, Erlich HA: Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 1988; 239: 487-91.

Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Hom GT, Erlich HA, Anheim N: Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 1985; 230: 1350-4.

Satoh M, Takahashi M, Sakamoto T, Hiroe M, Marumo F and Kimura A: Structural analysis of the titin gene in hypertrophic cardiomyopathy: identification of a novel disease gene. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 262: 411-417.

Seidman CE and Seidman JG: Hypertrophic cardiomyopathy. In Scriver, CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, Childs B, Kinzler KW and Vogelstein B (eds), *The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease*, 8th edn. McGraw-Hill, New York, Vol.IV, pp. 5418-5433.

Seidman JG, Seidman C: The genetic basis for cardiomyopathy: from mutation identifications to mechanistic paradigms. *Cell* 2001; 104: 557-67.

Sheffield VC, Beck JS, Kwitek AE, Sandstrom DW, Stone EM: The sensitivity of single-strand conformation polymorphism analysis for the detection of single base substitutions. *Genomics* 1993; 16: 325-32.

Sjostrom M. and Squire JM: Fine structure of the A-band in cryo-sections. The structure of the A-band of human skeletal muscle fibres from ultra-thin cryo-sections negatively stained. *J Mol Biol* 1977; 109: 49-68.

Speel EJM, van der Ven PFM, Albrechts JCM, Ramaekers FCS, Fürst DO, and Hopman AHN: Assignment of the Human Gene for the Sarcomeric M-Band Protein Myomesin (MYOM1) to 18p11.31-p11.32. *Genomics* 1998; 54: 184-86.

Steiner F, Weber K, Fürst DO: M band proteins myomesin and skelemin are encoded by the same gene: analysis of its organization and expression. *Genomics* 1999; 56: 78-89.

Stryer L: Biochemie 1990. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg. 2.Auflage.

Thierfelder L, Watkins H, MacRae C *et al*: Alpha-tropomyosin and cardiac troponin T mutations cause familial hypertrophic cardiomyopathy: a disease of the sarcomere. *Cell* 1994; 77: 701-12.

Torricelli F, Gilorami F, Olivotto I *et al*: Prevalence and clinical profile of troponin T mutations among patients with hypertrophic cardiomyopathy in toscany. *Am J Cardiol* 2003; 92: 1358-62.

Van Driest SL, Ellsworth EG, Ommen SR, Tajik AJ, Gersh BJ, Ackerman MJ: Prevalence and spectrum of thin filament mutations in an outpatient referral population with hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation* 2003; 108: 445-451.

Wang SM *et al*: Role of M-line proteins in sarcomeric titin assembly during cardiac myofibrillogenesis. *J Cell Biochem* 1998;71: 82-95.

Watkins H, McKenna WJ, Thierfelder L *et al*: Mutations in the genes for cardiac troponin T and alpha-tropomyosin in hypertrophic cardiomyopathy. *N Engl J Med* 1995; 332: 1058-64.

Yang YG *et al*: Developmental relationship of myosin binding proteins (myomesin, connectin and C-protein) to myosin in chicken somites as studied by immunofluorescence microscopy. *Cell Struct Funct* 2000; 25: 177-85.

8. Danksagung

Ich möchte Herrn Prof. Dr. K.J.Osterziel für die Möglichkeit danken, meine Doktorarbeit in seiner Arbeitsgruppe anfertigen zu dürfen.

Bei Herrn Dr. Haverkamp bedanke ich mich ganz herzlich für die Übernahme der Betreuung. Ein besonderer Dank geht an Herrn Andreas Perrot für die unermüdliche Unterstützung in allen theoretischen Fragen und Problemstellungen.

Den Mitgliedern der Arbeitsgruppe danke ich für das angenehme Arbeitsklima. Frau A. Kostner und Frau U. Weiher gebührt mein Dank für die Einarbeitung in die technischen Geräte des Labors.

Über allem steht jedoch der Dank an meinen Mann für seine endlose Geduld und Unterstützung sowie an meinen Sohn Pablo, der mir viel Kraft auf den letzten Metern gegeben hat.

9. Erklärung

“Ich, Verónica León Pérez, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema “Genetische Analyse im M-Banden-Protein Myomesin bei Patienten mit Hypertropher Kardiomyopathie“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die unzulässige Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Datum

Unterschrift

10. Curriculum Vitae

„Mein Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht mit veröffentlicht“.