

Aus dem KardioGenetischen Labor
im Experimental & Clinical Research Center (ECRC), Berlin-Buch/
Medizinische Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Genetische Analyse der Muscle-specific RING finger Proteine 1,
2 und 3 bei Patienten mit familiärer dilatativer
Kardiomyopathie**

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Zvetelina Vassileva

aus Sofia, Bulgarien

Gutachter/in: 1. Priv.-Doz. Dr. med. C. Özcelik
 2. Prof. Dr. med. T. Neumann
 3. Priv.-Doz. Dr. med. R. Dechend

Datum der Promotion: 25.10.2013

Meiner Familie gewidmet

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	IV
Abbildungsverzeichnis	IX
Tabellenverzeichnis	XII
1 Einleitung	1
1.1 Kardiomyopathien und Klassifikation.....	1
1.2 Dilatative Kardiomyopathie	3
1.3 Familiäre dilatative Kardiomyopathie (fDCM).....	5
1.4 Genetik der fDCM.....	5
1.5 Muscle-specific RING finger Proteine (MURFs)	8
1.5.1 MURF 1	9
1.5.2 MURF 2	11
1.5.3 MURF 3	11
2 Zielsetzung der Arbeit	13
3 Materialien und Methoden	14
3.1 Materialien.....	14
3.1.1 Geräte	14
3.1.2 Computerprogramm	15
3.1.3 Verbrauchsmaterialien	15
3.1.4 Chemikalien	16
3.1.5 Enzyme und Nukleotide	16
3.1.6 Molekulargewichtsmarker.....	17

3.1.7	Kits	17
3.1.7.1	PCR-Kit (Stratec).....	17
3.1.7.2	BigDye Terminator Kit v 1.1 (ABI-Prism).....	17
3.1.8	Wasser	17
3.1.9	Patientenkollektiv	17
3.2	Methoden	18
3.2.1	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	18
3.2.2	Gelelektrophorese zur Überprüfung der PCR.....	20
3.2.3	Probleme bei der PCR.....	22
3.2.4	Enzymatische Aufreinigung der PCR Produkte.....	22
3.2.5	Sequenzierung	23
3.2.6	Auswertung der Sequenzierung	24
3.2.7	Anmerkung.....	25
4	Ergebnisse.....	26
4.1	PCR - Probleme und Ergebnisse	26
4.2	Sequenzierungsergebnisse	28
4.3	Gefundene Varianten in MURF 1	28
4.3.1	Synonyme bekannte Varianten	29
4.3.2	Nicht-synonyme bekannte Varianten	30
4.3.3	Sequenzierungsfehler	31
4.4	Gefundene Varianten in MURF 2	32
4.4.1	Synonyme bekannte Varianten	33
4.4.2	Nicht-synonyme bekannte Variante	34
4.4.3	Sequenzierungsfehler	35
4.5	Gefundene Varianten in MURF 3	35

4.5.1	Synonyme bekannte Varianten	36
4.6	Zusammenfassung der Ergebnisse.....	38
5	Diskussion	40
5.1	Überblick	40
5.2	Methoden	40
5.3	Mögliche Varianten	41
5.4	Ergebnisse der genetischen Analyse von MURF 1, 2 und 3 und deren Bedeutung.	43
5.5	Ausblick.....	46
6	Zusammenfassung	47
	Literaturverzeichnis	XIII
	Anhang.....	XVII
	Danksagung.....	XXIV
	Lebenslauf.....	XXV
	Eidesstattliche Erklärung.....	XXVI

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
Abb.	Abbildung
AHA	American Heart Association
Ala	Alanin
Ao	Aorta
Arg	Arginin
ARVD/C	Arrhythmogene rechtsventrikuläre Dysplasie/ Kardiomyopathie
Asp	Asparaginsäure
ATP	Adenosintri-phosphat
AV-Block	atrioventrikulärer-Block
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
°C	Grad Celsius
Ca ²⁺	Calcium-Ion
cDNA	copyDNA; komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CVPT	Catecholaminergic Polymorphic Ventricular Tachycardia
dATP	2'-Desoxyadenosin-5'-triphosphat
DCM	dilatative Kardiomyopathie
dCTP	2'-Desoxycytosin-5'-triphosphat
ddNTPs	Didesoxynucleotide
dGTP	2'-Desoxyguanosin-5'-triphosphat

d.h.	das heißt
dH ₂ O	deionisiertes Wasser
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP(s)	Desoxynukleotid-Triphosphat(e)
dTTP	2'-Desoxythymidin-5'-triphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EKG	Elektrokardiogramm
ESC	Europäische Gesellschaft für Kardiologie
fDCM	familiäre dilatative Kardiomyopathie
FHL2	four-and-a-half LIM Domäne
G	Guanin
ggf.	gegebenenfalls
Glu	Glutaminsäure
Glu- MT	Glutaminsäure-Mikrotubuli
GMEB-1	glucocorticoid modulatory element binding 1
HCM	hypertrophe Kardiomyopathie
HiDi-Formamid	reines Formamid
His	Histidin
HPLC	Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie
iDCM	idiopathische Dilatative Kardiomyopathie
ISOT 3	Isopeptidase T 3

K.	Negativkontrolle
Kb	kilobase
KHK	Koronare Herzkrankheit
l	liter
Leu	Leucin
LH	linke Hauptkammer (Ventrikel)
LQTS	Long-QT-Syndrom
LV	linksventikulär
LVEDD	linksventrikulärer enddiastolischer Durchmesser
LVEF	linksventrikuläre Ejektionsfraktion
LVNC	Linksventrikuläre Non-Compaction
Lys	Lysin
M.	Molekulargewichtsmarker Typ VIII
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
ml	Milliliter
MURF(s)	Muscle-specific RING finger Protein(s)
mV	Millivolt
ng	Nanogramm
NH ₄	Ammonium-Ion
N-RAP	nebulin-related anchoring protein
Pa	Pulmonalarterie
PCR	Polymerase-Kettenreaktion

pmol	pikomol
RACK1	Rezeptor für aktivierte Proteinkinase C
RCM	restriktive Kardiomyopathie
RFLP	Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus
RH	Rechter Hauptkammer (Ventrikel)
RING	Really Interesting New Gene
RV	rechter Vorhof
s.	siehe
SMRZ	striated muscle RING zinc finger
SNP(s)	Single Nucleotide Polymorphism(s)
SNP ID	Single Nucleotide Polymorphism Identifikationsnummer
SQTS	Short-QT-Syndrom
SUMO-3	Small ubiquitin-related modifier 3
SUNDS	sudden unexplained nocturnal death syndrome
syn.	synonym
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TBE	Tris-HCL-Borat-Ethylendiamintetraacetat
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-propan-1,3-diol
Ubc-9	Ubiquitin carrier protein 9
UTR	untranslatierter Bereich
UV-Licht	Ultraviolettes Licht

Val	Valin
VF	ventrikuläre Verkürzungsfraction
WHO	World Health Organisation
z.B.	zum Beispiel
µl	Mikroliter

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Organisation des Sarkomers in der Herzmuskulatur. Aktin, Myosin und Titin stellen die myofilamäneren Hauptproteine dar. Zu beachten ist das Bandenmuster, das aus deren Anordnung resultiert	1
Abbildung 2: Klassifikation der Kardiomyopathien nach der AHA	2
Abbildung 3: Klassifikation der Kardiomyopathien nach der ESC	3
Abbildung 4: Dilatative Kardiomyopathie: links ist ein normales Herz abgebildet, rechts – ein Herz mit dilatativer Kardiomyopathie. Zu beachten sind die erweiterten (dilatierten) Herzkammern; folglich entsteht eine eingeschränkte Pumpfunktion.....	4
Abbildung 5: Favorisierte Hypothese zur Pathophysiologie der genetisch bedingten dilatativen Kardiomyopathie	5
Abbildung 6: Struktur von MURF 1, 2 und 3; identische Aminosäurereste sind farbig abgebildet: Cystein- und Histidinreste, die als Zinkchelatoren fungieren, sind gelb bzw. rot, ähnliche Aminosäurereste sind grau hinterlegt.....	9
Abbildung 7: Schematische Darstellung des PCR-Zyklus	18
Abbildung 8: DNA-Molekulargewichtsmarker pUC Typ VIII.....	22
Abbildung 9: Visualisierung der Sequenz mittels Gel-Elektrophorese. Durch das kleinste am weitesten gewanderte fluoreszenzmarkierte Fragment wird das erste Nukleotid in der Sequenz angezeigt	23
Abbildung 10: Klare Bande in der Negativkontrolle bei der Gelelektrophorese am Beispiel des Exons 4, MURF 2. Zum Vergleich: saubere Negativkontrollen von MURF 1, Exon 1.....	26
Abbildung 11: Ergebnis der Gradienten-PCR am Beispiel von Exon 2, MURF 2. Die Annealingtemperaturen (°C) sind eingegeben. Als günstig ergab sich die Temperaturspanne zwischen 65,7°C bis 70°C	27
Abbildung 12: Gelelektrophoreseergebnisse zur Überprüfung der PCR am Beispiel von Exon 2, MURF 2. Ein sauberes PCR-Produkt ist vorhanden. (Annealingtemperatur 68°C, 38 Zyklen)	27

- Abbildung 13: Sequenzausschnitt des Chromatogramms im Programm Sequencher 4.10.1 für MURF 1, Exon 1. Oben heterozygoter SNP c.135G>C. Zum Vergleich unten eine Wildtyp-Sequenz. Der SNP ist mit einem Pfeil gekennzeichnet29
- Abbildung 14: Sequenzausschnitt des Chromatogramms im Programm Sequencher 4.10.1 für MURF 1, Exon 5. Es werden untereinander eine Wildtyp-Sequenz, ein homozygoter und ein heterozygoter SNP angezeigt. Die betroffene Base ist schwarz markiert30
- Abbildung 15: Sequenzausschnitt des Chromatogramms im Programm Sequencher 4.10.1 für MURF 1, Exon 4. Die nicht-synonyme homozygote neue Variante konnte bei einer erneuten Sequenzierung nicht bestätigt werden. Es werden untereinander eine Wildtyp-Sequenz, die erste und die zweite Sequenzierung der Probe angezeigt. Zu beachten ist das schlechte Signal/Hintergrund-Verhältnis bei der ersten Sequenzierung der Probe, das offensichtlich zu dem Fehlergebnis geführt hat. Die betroffene Base ist schwarz markiert32
- Abbildung 16: Sequenzausschnitt des Chromatogramms im Programm Sequencher 4.10.1 für MURF 2, Exon 5. Die Signalstörungen befinden sich an der gleichen Stelle bei allen ausgewerteten 92 Sequenzen. Die auffälligen Stellen sind mit einem Pfeil gekennzeichnet33
- Abbildung 17: Sequenzausschnitt des Chromatogramms im Programm Sequencher 4.10.1 für MURF 2, Exon 8. Die neue synonyme homozygote Variante konnte bei den wiederholten Sequenzierungen nicht bestätigt werden. Es werden untereinander eine Wildtyp-Sequenz, die erste und die zweite Sequenzierung der Probe angezeigt. Die betroffene Base ist schwarz markiert35
- Abbildung 18: Sequenzausschnitt des Chromatogramms im Programm Sequencher 4.10.1 für MURF 3, Exon 5. Es werden untereinander eine Wildtyp-Sequenz, ein homozygoter und ein heterozygoter SNP angezeigt. Die betroffene Base ist schwarz markiert. Zu beachten sind die Signalstörungen, die an gleicher Stelle bei allen ausgewerteten 92 Sequenzen auftraten; hier am Beispiel von den 3 Proben mit einem Pfeil gekennzeichnet.....36
- Abbildung 19: Überblick über die im Rahmen dieser Arbeit gefundenen Varianten in MURF 1.....39
- Abbildung 20: Überblick über die im Rahmen dieser Arbeit gefundenen Varianten in MURF 2.....39

Abbildung 21: Überblick über die im Rahmen dieser Arbeit gefundenen Varianten in MURF 2.....	39
Abbildung 22: Schematische Darstellung der möglichen Ergebnisse einer genetischen Analyse. Die Frequenz in der Bevölkerung und die Pathogenität der festgestellten Varianten werden in Betracht gezogen.....	42

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht der bisher bekannten Krankheitsgene einer DCM. Es sind die chromosomalen Loci, ihre zu kodierenden Proteine, Lokalisation und Häufigkeit (von Hershberger et al. (2010) geschätzte Zahlen aus der Literatur) dargestellt. Die Reihenfolge der Gene ergibt sich aus dem Erscheinungsjahr in der Literatur	6
Tabelle 2: Länge des dazwischenliegenden Intronbereichs und der beiden Exons, die als ein Fragment amplifiziert werden konnten	19
Tabelle 3: PCR-Standard-Ansatz.....	20
Tabelle 4: PCR-Programm	20
Tabelle 5: 5 x TBE-Puffer	21
Tabelle 6: 3%iges Agarosegel	21
Tabelle 7: Auftragspuffer	21
Tabelle 8: Komponente des Master-Mixes für die enzymatische Aufreinigung.....	23
Tabelle 9: Komponente des Master-Mixes für die Cyclesequencing.....	24
Tabelle 10: Programm für die Cyclesequencing	24
Tabelle 11: Gefundene synonyme bekannte Varianten in MURF 1	30
Tabelle 12: Gefundene nicht-synonyme bekannte Varianten in MURF 1	31
Tabelle 13: Alle gefundenen synonymen bekannten Varianten in MURF 2	33
Tabelle 14: Gefundene nicht-synonyme bekannte Varianten in MURF 2	34
Tabelle 15: Gefundene synonyme bekannte Varianten in MURF 3	37
Tabelle 16: Gefundene Varianten und deren Allelfrequenz in MURF 1, 2 und 3 im Kollektiv von 92 Patienten mit fDCM	38
Tabelle 17: Homologievergleich des betroffenen Bereichs in MURF 1. Die Aminosäureposition 269 ist rot markiert (Variante Glu269Lys)	44
Tabelle 18: Homologievergleich des betroffenen Bereichs in MURF 2. Die Aminosäureposition 140 ist rot markiert (Variante Glu140Lys)	44

1 Einleitung

1.1 Kardiomyopathien und Klassifikation

Das Herz ist ein muskuläres Hohlorgan, das den kontinuierlichen Blutfluss im Körper durch rhythmische Kontraktionen und Wechsel von Systole und Diastole aufrechterhält. Die kleinste funktionelle Einheit des Herzmuskels ist das Sarkomer, das aus einer Vielzahl von regelmäßig angeordneten Strukturproteinen (Myofilamente) aufgebaut ist (Abb. 1).

Es gibt viele Erkrankungen, die den Herzmuskel betreffen können und zu einer Herzinsuffizienz, einer nicht ausreichenden Funktion des Herzens, führen können. Zu ihnen zählen vorrangig die koronare Herzkrankheit (KHK), die arterielle Hypertonie und die Kardiomyopathien.¹

Kardiomyopathien umfassen alle primären oder sekundären, angeborenen oder erworbenen Erkrankungen des Myokards, die zu einer morphologischen und ggf. funktionellen Alteration der mechanisch-kontraktile und elektrischen Funktion des Herzmuskels führen.² Die WHO-Klassifikation aus dem Jahr 2005 beschreibt Kardiomyopathien als Erkrankungen des Myokards mit kardialer Dysfunktion und unterscheidet zwischen dilatativer (DCM), restriktiver (RCM), hypertropher (HCM) und arrhythmogener rechtsventikulärer Kardiomyopathie (ARVC).³ Es wurde 2006 eine neue Klassifikation durch die American Heart Association (AHA) etabliert, die sich im Gegensatz zu der alten am relativen Anteil einer genetischen bzw. erworbenen Ursache orientiert.⁴ Danach sind Kardiomyopathien eine heterogene Gruppe von Krankheiten des Herzmuskels, die mit einer elektrischen und/oder mechanischen Funktionsstörung des Herzens einhergehen und üblicherweise eine unangemessene Hypertrophie oder Dilatation der Herzkammern verursachen. Die primären

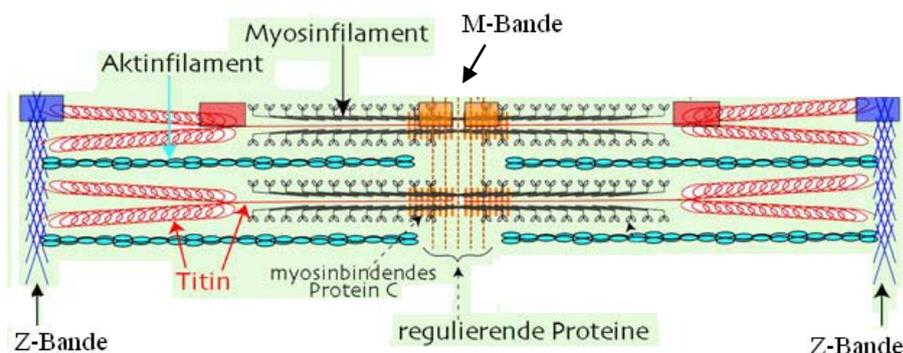


Abbildung 1: Organisation des Sarkomers in der Herzmuskulatur. Aktin, Myosin und Titin stellen die myofilamänteren Hauptproteine dar. Zu beachten ist das Bandenmuster, das aus deren Anordnung resultiert.^A

Kardiomyopathien werden in genetische, gemischte und erworbene Erkrankungen unterteilt (Abb. 2). Grundlage dieser Klassifikation ist der genetische Phänotyp.

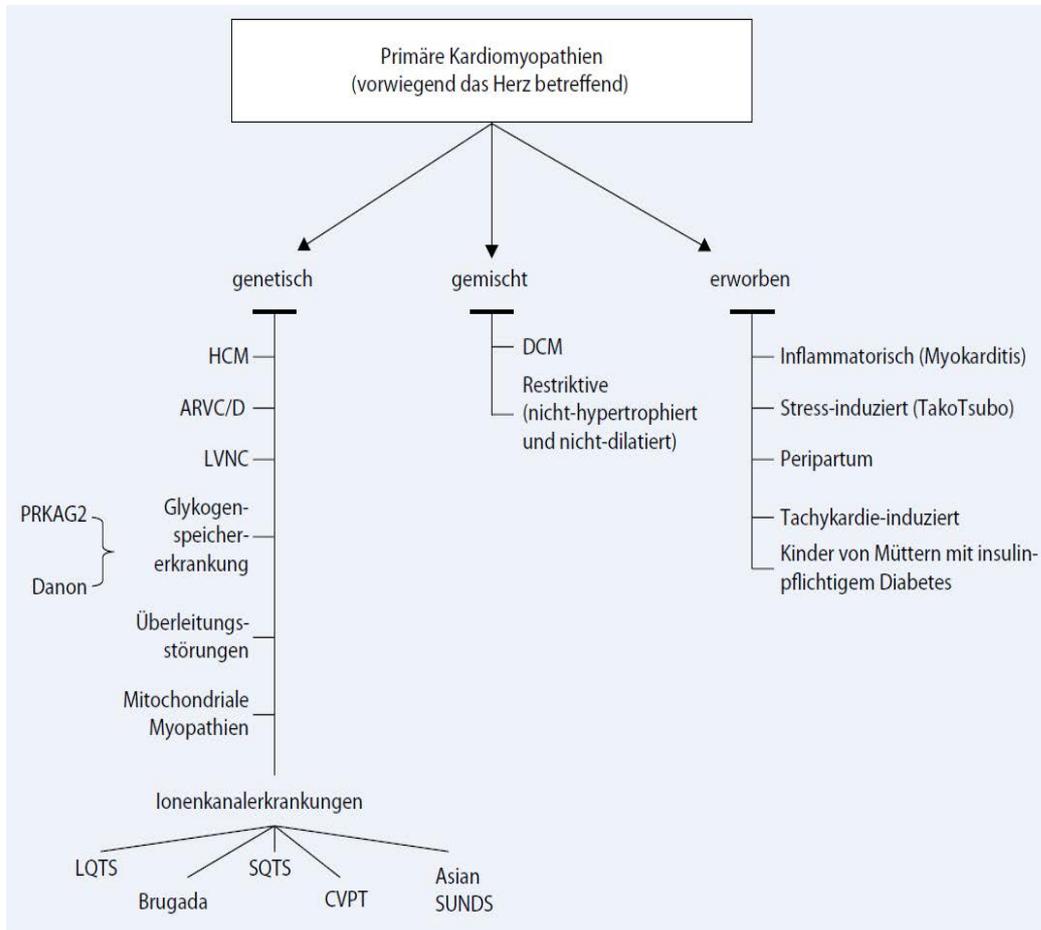


Abbildung 2: Klassifikation der Kardiomyopathien nach der AHA⁵

Eine überarbeitete Klassifikation wurde auch von der Europäischen Gesellschaft für Kardiologie (ESC) im Jahr 2008 vorgelegt.⁶ Die Einteilung erfolgt dabei nach morphologisch-funktionellen Phänotypen. Die Unterscheidung zwischen primären und sekundären Kardiomyopathien fehlt, die Ionenkanalerkrankungen werden nicht mit berücksichtigt. Es wird aber zwischen einer familiär/genetischen und nicht-familiären Form unterschieden (Abb. 3). Die ESC erzielt damit nicht nur eine einheitlichere Diagnostik von Kardiomyopathien, sondern auch die Betonung einer genetischen und kombinierten Ursache der Erkrankung. Nach Kreuder (2004) sind mindestens 30-40% der Kardiomyopathien genetisch bedingt oder zumindest begünstigt.²

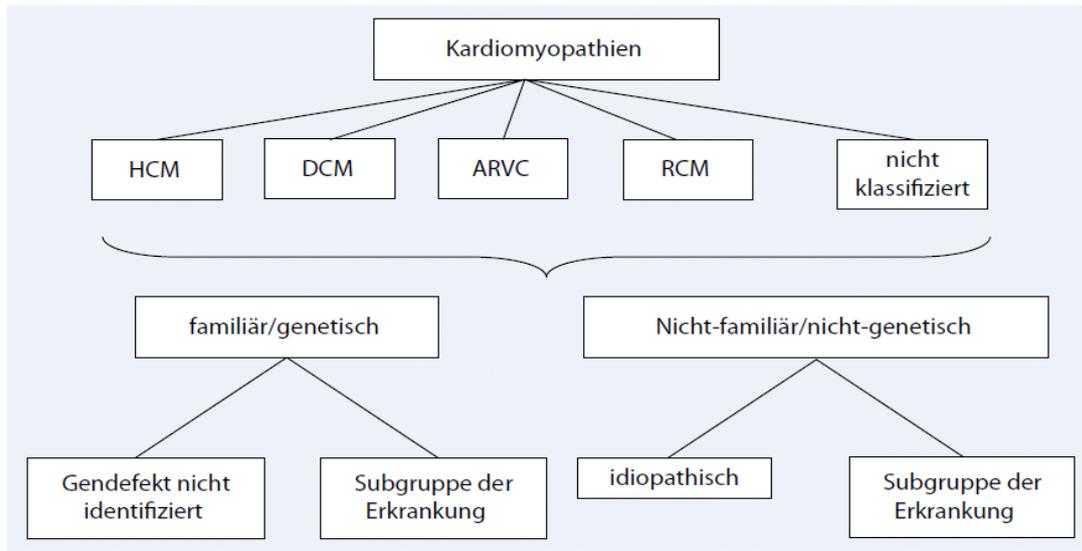


Abbildung 3: Klassifikation der Kardiomyopathien nach der ESC⁵

1.2 Dilatative Kardiomyopathie

Die dilatative Kardiomyopathie (DCM) stellt eine Gruppe von Kardiomyopathien dar, bei der die Patienten einen dilatierten und schlecht arbeitenden linken Ventrikel mit systolischer Funktionsstörung ohne abnormale Füllungskonditionen (z.B. Bluthochdruck) zeigen (Abb. 4). Ausgeschlossen wird noch eine ischämische Herzerkrankung, die ausreichen würde, um eine globale systolische Beeinträchtigung hervorzurufen.⁶ Die DCM wird charakterisiert durch: einen linksventrikulären enddiastolischen Durchmesser (LVEDD), der größer als 55 mm ist, eine linksventrikuläre Ejektionsfraktion (LVEF), die weniger als 50%-45% beträgt und eine Verkürzungsfraction – das Verhältnis zwischen linksventrikulärem endsystolischem und enddiastolischem Durchmesser – von weniger als 25 %.⁷

Die Erkrankung wird nach AHA der Gruppe der gemischten Kardiomyopathien (genetisch oder erworben) zugeordnet und hat eine heterogene Ätiologie. Genetische Ursachen sowie entzündliche, autoimmune und virale Faktoren oder toxische Schädigungen können dabei eine Rolle spielen. Auch Stoffwechselstörungen, primäre Muskelerkrankungen, kardiotoxische Medikamente, erhöhter Alkoholkonsum und eine Schwangerschaft werden mit der Entwicklung einer DCM in Verbindung gebracht.^{4, 8} Vermutlich spielen verschiedene Faktoren in unterschiedlicher Ausprägung bei der Entstehung der Erkrankung eine Rolle.⁵ Trotz intensiver Diagnostik kann aber bei bis zu 50% der Patienten mit DCM keine ätiopathogenetische Ursache festgestellt werden, sodass dann die Erkrankung unter dem Begriff der idiopathischen DCM (IDC) zusammengefasst wird.⁹

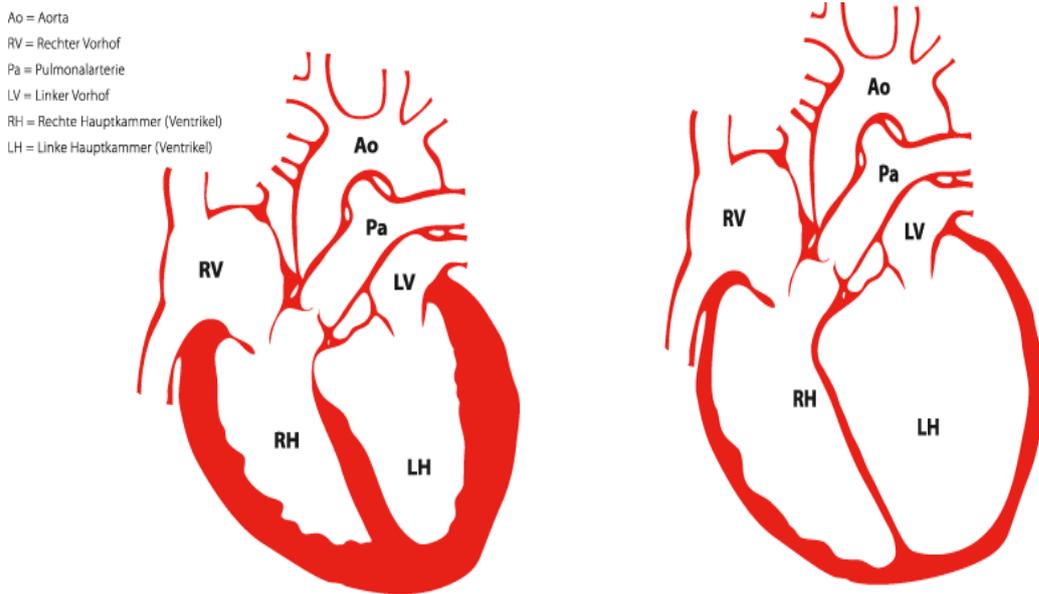


Abbildung 4: Dilatative Kardiomyopathie: links ist ein normales Herz abgebildet, rechts – ein Herz mit dilatativer Kardiomyopathie. Zu beachten sind die erweiterten (dilatierten) Herzkammern; folglich entsteht eine eingeschränkte Pumpfunktion.^B

Mit einer Prävalenz von ungefähr 1:2500 und einer Inzidenz 7/100.000/Jahr stellt die DCM die dritthäufigste Ursache für Herzinsuffizienz und die häufigste Ursache für eine Herztransplantation dar.⁴ Favorisierte Hypothese zur Pathophysiologie der Erkrankung ist, dass aufgrund von Veränderungen von Sarkomerproteinen und Zytoskelettproteinen sowie Störungen der intrazellulären Calciumkonzentration, es zur gestörten Kraftentwicklung oder zur verminderten Kraftübertragung kommt (Abb. 5).² Infolge von Volumen- und Drucküberlastung des linken Ventrikels führt die DCM dann oft zum klinischen Bild einer Herzinsuffizienz. Je nach Schweregrad der Erkrankung manifestiert sie sich mit den Symptomen von einer Herzinsuffizienz, von Herzrhythmusstörungen oder von Thrombembolien. Typisch ist die Leistungsschwäche. Atemnot, Belastungsinsuffizienz, Ödeme, Synkopen oder plötzlicher Herztod können auftreten.¹⁰ Die 5-Jahres-Sterblichkeitsrate nach der Diagnosestellung liegt bei 30-50%.^{11, 12}

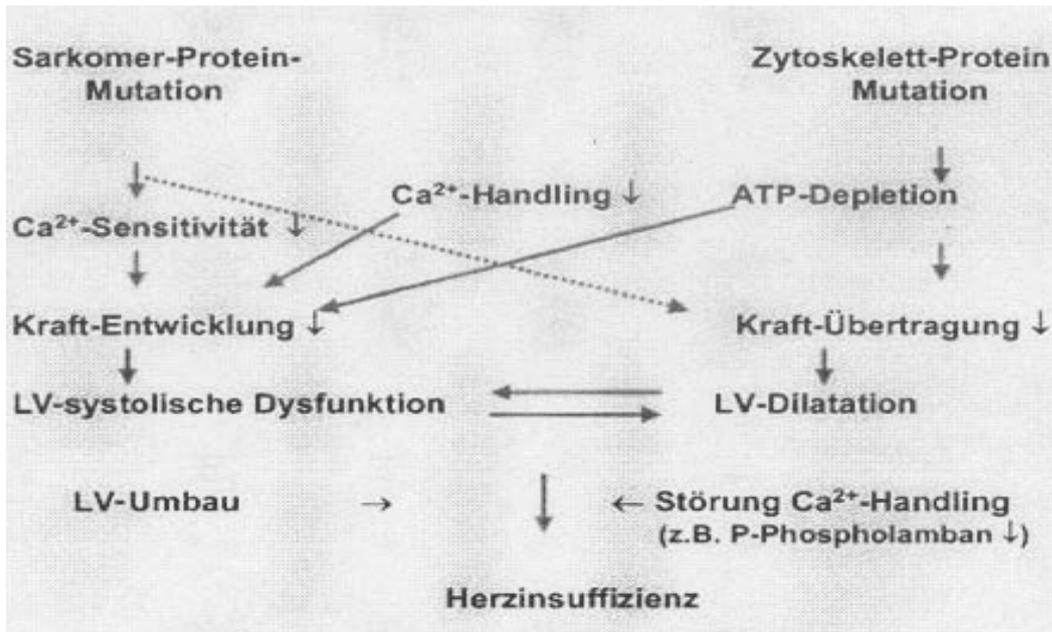


Abbildung 5: Favorisierte Hypothese zur Pathophysiologie der genetisch bedingten dilatativen Kardiomyopathie²

1.3 Familiäre dilatative Kardiomyopathie (fDCM)

In 20% bis 50% der DCM-Fälle konnte eine familiäre Häufung beobachtet werden.¹³ Eine fDCM liegt vor, wenn mindestens zwei Personen innerhalb einer Familie eine idiopathische DCM aufweisen oder wenn ein Angehöriger ersten Grades an einen unerklärten Herztod vor dem 35. Lebensjahr gestorben ist.⁷ Die Erkrankung manifestiert sich meistens zwischen dem 30. und 50. Lebensjahr, kann jedoch auch im Säuglingsalter, bei kleinen Kindern sowie im Seniorenalter auftreten.¹³ Ähnlich wie die idiopathische DCM kann die fDCM lange Zeit symptomlos bleiben. Sie zeichnet sich auch durch die Symptome einer Herzinsuffizienz, durch thromboembolische Ereignisse und durch Arrhythmien aus.^{8, 10}

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich damit, die fDCM und ihre Krankheitsgene näher zu untersuchen.

1.4 Genetik der fDCM

Bis heute wurden insgesamt mehr als 30 Krankheitsgene beschrieben, deren Mutationen für die Entstehung einer DCM verantwortlich gemacht werden (Tab. 1).^{8, 14} Diese kodieren für Proteine unterschiedlicher Lokalisation und Funktion. Es handelt sich um eine

bemerkenswerte Locus-Heterogenität, die mit wenigen anderen genetischen Erkrankungen vergleichbar ist.⁸

Tabelle 1: Übersicht der bisher bekannten Krankheitsgene einer DCM. Es sind die chromosomalen Loci, ihre zu kodierenden Proteine, Lokalisation und Häufigkeit (von Hershberger et al. (2010) geschätzte Zahlen aus der Literatur) dargestellt. Die Reihenfolge der Gene ergibt sich aus dem Erscheinungsjahr in der Literatur.^{8, 13, C1}

Gen	Chromosomaler Locus	Protein	Häufigkeit	Lokalisation
autosomal-dominante DCM-Mutationen				
ACTC	15q14	Kardiales Aktin	0.005	Sarkomer
LMNA	1q22	Lamin A/C	0.06	Zellkernmembran
DES	2q35	Desmin	0.003	Zytoskelett
SGCD	5q33	δ -sarcoglycan	0.003	Zytoskelett
MYH7	14q11.2	β -Myosin-Schwerkette	0.042	Sarkomer
TNNT2	1q32	Kardiales Troponin T	0.029	Sarkomer
TPM1	15q22	α -Tropomyosin	0.006	Sarkomer
TTN	2q31	Titin	nicht bekannt	Sarkomer
VCL	10q22	Metavinkulin	0.01	Sarkomer
MYBPC3	11p11	Myosinbindendes Protein c	0.02	Sarkomer
MLP/CSRP3	11p15	Muskel-LIM-Protein	0.003	Z-Scheibe
ACTN2	1q43	α -Aktinin 2	0.009	Sarkomer
PLN	6q22	Phospholamban	nicht bekannt	Sarkoplasmatisches Retikulum
ZASP/LDB3	10q23	Cypher	0.01	Zytoskelett
MYH6	14q11	α -Myosin-Schwerkette	0.043	Sarkomer
SCN5A	3p22	Natrium-Kanal 5A	0.026	Sarkolemm
ABCC9	12p12	ATP-sensitiver Kaliumkanal	0.006	Sarkolemm
TNNC1	3p21	Kardiales Troponin C	0.004	Sarkomer
TCAP	17q12	Titin-cap oder Telethonin	0.01	Z-Scheibe
EYA4	6q23	Eyes-absent 4	nicht bekannt	Zellkern
TMPO	12q23	Thymopoietin	0.011	Zellkern
PSEN1/2	1q42/14q24	Presenelin 1/2	0.01	Sarkolemm

CRYAB	11q23	Alpha B crystalin	0.007	Zytoskelett
PDLIM3	4q35	PDZ LIM Domäne Protein 3	0.005	Zytoskelett
MYPN	10q21	Myopalladin	0.035	Z-Scheibe
LAMA4	6q21	Laminin a-4	0.011	Extrazellulärmatrix-Protein
ILK	11p15	Integrin-linked Kinase	0.005	Zytoplasma
ANKRD1	10q23	Ankyrin repeat domain containing protein 1 (CARP)	nicht bekannt	Z-Scheibe
RBM20	10q25	RNA-bindendes Protein 20	0.019	Zellkern
Autosomal-rezessive DCM Mutationen				
TNN13	19q13	Kardiales Troponin I	0.004	Sarkomer
DSP	6p24	Desmoplakin	nicht bekannt	Desmosom
X-chromosomale DCM Mutationen				
DMD	Xq21	Dystrophin	nicht bekannt	Zytoskelett
TAZ/G4.5	Xq28	Taffazin	nicht bekannt	Mitochondrien

In 90% der Fälle ist die fDCM autosomal-dominant vererbt. Mutationen in den Genen für Lamin A/C, α - und β -Myosin-Schwerkette treten relativ häufig auf. Eine X-chromosomale Vererbung ist in 5-10% der Fälle die Ursache für die fDCM, wobei meistens verschiedene Mutationen im Dystrophin-Gen dafür ausschlaggebend sind.¹⁰ Bei einer Reihe von X-Chromosom-gebundenen Erkrankungen, z.B. Becker's und Duchenne's Muskeldystrophien, taucht die DCM auch auf. Desweiteren entdeckte die McKenna-Gruppe, dass eine bekannte Mutation des kardialen Troponin I, eines Regulatorproteins der Aktinfilamente, ursächlich für einen rezessiven Erbgang der DCM sei.¹⁵ Das Zelladhäsionsprotein Desmoplakin wurde auch als autosomal-rezessiv vererbtes Krankheitsgen identifiziert. Eine fDCM kann bei Patienten auftreten, die Mutationen der mitochondrialen DNA oder erblich bedingte Stoffwechselerkrankungen aufweisen. Extrakardiale Manifestationen, z.B. eine Beteiligung der Skelettmuskulatur müssen auch in Betracht gezogen werden.¹⁶

Wichtig für das individuelle Erscheinungsbild der fDCM ist, dass man den genetischen Hintergrund kennt, d.h. man erhebt eine Familienanamnese. Ist die Familienanamnese positiv, sollten die Angehörigen 1. Grades einem klinischen Screening mittels EKG und Echokardiographie unterzogen werden. Damit kann man einerseits weitere Betroffene identifizieren und rechtzeitig behandeln, andererseits kann man auch Personen aus der Risikogruppe ausschließen.¹⁶

Die Genetik der fDCM unterscheidet sich erheblich von den anderen Kardiomyopathien. Mehr als 30 bekannten Krankheitsgene kodieren jeweils für einen sehr kleinen Anteil der Fälle. So sind die Mutationen in 14 Gene für etwa 28% der Fälle in einer Kohorte von 312 IDC/fDCM Patienten maßgeblich.¹⁷ Im Gegensatz dazu, sind bei HCM zwei Gene für 40-45% der Fälle verantwortlich, d.h. für 80-90% der Fälle, bei denen es sich um eine genetische Ursache handelt. Die Tatsache, dass selbst ein systematisches Screening in allen bekannten fDCM-Genen nur ca. 30-35% aller Fälle aufklären könnte, zeigt deutlich die Variabilität der Erkrankung.^{8, 18} Neben den bekannten Krankheitsgenen vermutet man weitere unbekannte Gene als Ursache für die fDCM.¹⁵

Im Rahmen dieser Arbeit werden die Muscle-specific RING finger Proteine als Kandidatengene für fDCM untersucht.

1.5 Muscle-specific RING finger Proteine (MURFs)

Spencer et al. und Centner et al. entdeckten im Jahr 2000 und 2001 eine neue Familie von RING (Really Interesting New Gene) Proteinen – die muskel-spezifischen RING finger Proteine (MURFs). Dazu gehören drei strukturell sehr ähnliche Proteine - MURF 1, MURF 2 und MURF 3 (bekannt auch als RNF 28, 29 und 30).

Sie werden von verschiedenen Genen kodiert, haben aber ein bis zu 85% homologes N-terminales Ende.¹⁹ MURFs haben eine N-terminale RING Domäne, eine Zink-bindende B-Box Domäne, eine MURF-Family-conserved Domäne und zwei Coiled-coil Domänen gemeinsam (Abb. 6). Die C-terminalen Domänen sind divergenter und haben auch ein unterschiedliches Splicing. Sie zeichnen sich durch einen hohen Gehalt an Asparagin- und Glutaminsäureresten aus. Alle drei Proteine können miteinander interagieren, in dem sie Homo- und Heterodimere im Bereich der Coiled-coil-Domäne bilden.

Trotz sehr ähnlicher Struktur unterscheiden sich die MURFs in ihrem Genexpressionsmuster, Isoformen, Bindungspartnern, Lokalisation und Funktion.²⁰

Bis heute sind jedoch keine krankheitsverursachenden Mutationen in den drei Genen nachgewiesen worden.

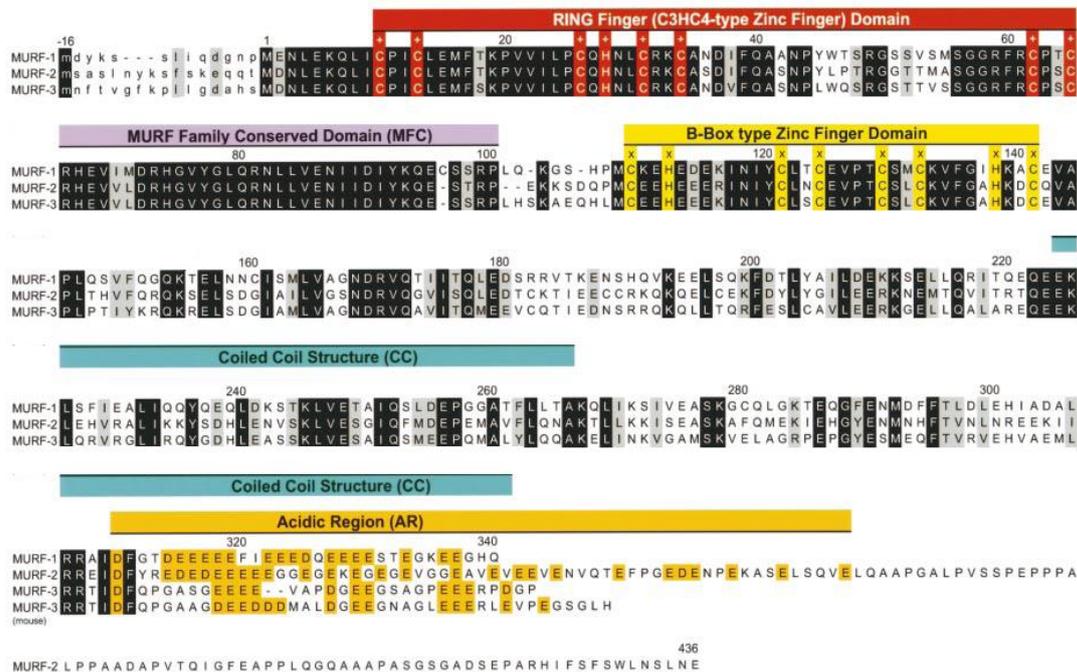


Abbildung 6: Struktur von MURF 1, 2 und 3; identische Aminosäurereste sind farbig abgebildet: Cystein- und Histidinreste, die als Zinkchelatoren fungieren, sind gelb bzw. rot, ähnliche Aminosäurereste sind grau hinterlegt.¹⁹

1.5.1 MURF 1

Das Protein MURF 1, auch SMRZ (striated muscle RING zinc finger) genannt, ist von dem Gen TRIM63 kodiert und nach Centner et al. auf Chromosom 1p31.1-p.33 lokalisiert. Es hat 9 Exons bei einer cDNA-Länge von 1,9kb und kodiert für ein Protein von 288 Aminosäuren.^{19, 21}

Es befindet sich sowohl im Bereich der M- und Z-Bande des Sarkomers in der Herz- und Skelettmuskulatur, als auch im Zellkern sowie im Zytoplasma. Das Vorkommen des Proteins in mehreren Zellkompartimenten ist wahrscheinlich auf die Bildung von Heterodimere z.B. mit dem sehr homologen MURF 2 zurückzuführen. Es reagiert auch mit sich selbst, indem es Homodimere bildet.¹⁵

Viele Untersuchungen haben MURF 1 als eine an proteolytischen Prozessen beteiligte E3-Ligase bestätigt. Es steuert gezielt die Ubiquitinierung und damit den Abbau ausgewählter Zielproteine im Muskel, z.B. den Abbau der β -Myosin-Schwerkette oder der Kreatin-Kinase.^{22, 23} Die bis 2009 angenommene Ligase-Aktivität bei Sarkomerproteinen im Herzen, z.B. bei kardialem Troponin I, wurde durch in vivo Versuche von Willis et al. Gruppe nicht

bestätigt.²⁴

Zellkultur-Studien deuten auf die Rolle von MURF1 für die Aufrechterhaltung der Integrität vom Titin im Bereich der M-Bande hin.²⁰ Titin ist neben Aktin und Myosin eines der wichtigsten Intermediärfilamente im Sarkomer. Es beinhaltet 320 Domänen, darunter eine Serine/Threonin Kinase Domäne in der M-Linie (auch als Titin-Kinase bezeichnet). Die Immunglobulin-Domänen A168-A169 befinden sich N-terminal zur Titin-Kinase am Ende der A-Bande in Titin im Sarkomer. Es wurde eine direkte Interaktion von A168-A169 mit dem Muskel-spezifischen RING Protein 1 nachgewiesen. Dadurch wird eine Modulation der Aktivität der Kinase angenommen und folglich auf die wichtige Rolle von MURF 1 für die Muskelstabilität und –struktur geschlossen.¹⁹ Knockout Mausexperimente bestätigen weiter die wichtige Bedeutung des Proteins für das Muskelgewebe. Bei einer Abwesenheit von MURF 1 zeigen die Tiere eine Resistenz gegen Muskelatrophie.²⁵ Mäuse, bei denen die Genexpression für MURF 1 und MURF 3 blockiert wurde, entwickeln eine Myopathie, deren Pathologie der humanen Myosin-Speicher-Myopathie ähnelt.²³

Ebenso stützte eine Reihe von Experimenten die Rolle von MURF 1 im Herzmuskelgewebe. Die Erhöhung der MURF 1 Konzentration kann die Entwicklung einer hypertrophen Kardiomyopathie anhalten.^{20, 22, 24, 26, 27} Im Gegensatz dazu führt die Abwesenheit des Proteins zur Entwicklung einer extremen Hypertrophie bei Druckbelastung des Herzens.^{23, 28} MURF 1 reguliert die Kardiomyozytengröße und –kontraktilität.^{24, 27} Durch zwei in vivo Modelle präsentieren im Jahr 2009 Willis et al. seine Regulatorfunktion bei Herzatrophie.²⁷ Es ist ein wichtiger und notwendiger Mediator für die Reduktion der Kardiomyozytengröße bei einer pathologischen Herzhypertrophie oder nach chronischer Dexamethasontherapie. Es wird angenommen, dass er eine Hauptrolle bei Reduktion der Herzmuskelgröße in vielen klinischen Situationen spielt.^{C2}

Willis et al. demonstrieren außerdem die Beteiligung von MURF 1 an dem Energiestoffwechsel des Herzens.²⁴ Es reagiert mit Muskelenzymen wie Kreatin-Kinase und Adenylat-Kinase, die am Metabolismus beteiligt sind. MURF 1 bewirkt die Phospho-Kreatin Transportmechanismen im Herzen, vermutlich durch die Steuerung von der Kreatin-Kinase Aktivität und deren Abbau. Da sie in enger Beziehung zur Herzinsuffizienz steht, wird vermutet, dass MURF 1 unerlässlich für den regelrechten Herzenergiestoffwechsel ist.

Durch die Assoziation von MURF 1 mit der M-Linie Titin und mit vielen unterschiedlichen Bindungspartnern (Nebulin, Troponin I und T, Myotilin, transkriptionelle Modulatoren wie

GMEB-1) wird seine große Rolle als Bindeglied bei der Ubiquitinierung, beim Kerntransport sowie bei der Genexpression angenommen.^{20, 29}

1.5.2 MURF 2

Das Protein MURF 2 ist vom Gen TRIM55 kodiert und auf Chromosom 8q12-q13 lokalisiert.^{C3} Es hat 11 Exons und ist zu 62% mit MURF 1 homolog.¹⁹

MURF 2 ist im Bereich der M-Bande und in den Mikrotubuli zu finden, wobei aber mehrere Studien verschiedene Lokalisationen in der Zelle belegen.^{19, 20} Es kann mit MURF 1 und MURF 3 interagieren und ist das einzige Protein der Familie, das während der Entwicklung herunter reguliert wird.

MURF 2 spielt eine wichtige Rolle für die Aufrechterhaltung der strukturellen Integrität der Muskelzelle.²⁶ Durch knock-down Experimente wird dessen Wichtigkeit für die M-Banden Region, für die Myoblastendifferenzierung und für die Myofibrogenese belegt.^{20, 26} Die Stabilität von spezifischen posttranslational modifizierten Glutaminsäure-Mikrotubuli (Glu-MT), auch stabile Mikrotubuli genannt, und von Intermediärfilamenten wie Desmin und Vimentin wird durch MURF 2 reguliert.

Studien zeigen viele identische Reaktionspartner für MURF 1 und 2 im Sarkomer, was auf eine funktionelle Redundanz hinweist.²⁹ Interessanterweise sind Mäuse, bei denen entweder nur MURF 1 oder 2 fehlen, normal; bei der Deaktivierung beider Proteine kommt es aber zu einer Herz- und Skelettmuskelhypertrophie.³⁰ Es wird angenommen, dass beide Proteine kooperativ, innerhalb eines Signalweges, bei der Remodellierung von Muskeln zusammenarbeiten.

1.5.3 MURF 3

Als erstes der MURF Familie wurde im Jahr 2000 von der Gruppe von Spencer et al. das mikrotubuliassoziierte Protein MURF 3 in der Maus entdeckt.³¹ Das Protein ist von dem Gen TRIM54 kodiert und auf Chromosom 2p21-16 lokalisiert.^{C4} Es hat 10 Exons und ist 77% mit MURF 1 und 65% mit MURF 2 identisch.¹⁹

MURF 3 ist außer in den Mikrotubuli auch in der M- und Z-Bande des Sarkomers lokalisiert.^{20, 31} Es ist während der Entwicklung hochreguliert und stellt ein Schlüssel-E3-

Enzym in dem Ubiquitin-Proteasom-System für den Turnover der Sarkomerproteine dar.²³ Es kontrolliert den Abbau von den Proteinen FHL2 (four-and-a-half LIM Domäne), γ -filamin und β -Myosin-Schwerkette.^{23, 32}

MURF 3 ist für die Myogenese und Mikrotubulistabilität relevant.^{20, 31} Seine Anwesenheit ist für die Bildung von den Glu-MT erforderlich, die sich durch eine bessere Stabilität auszeichnen und Voraussetzung für Muskeldifferenzierung, Genexpression und Verschmelzung von Myotuben sind. Es wird vermutet, dass MURF 3 das Bindeglied zwischen Titin, Mikrotubuli und Myogenese darstellen könnte.

Die Gruppe von Fielitz et al. zeigte durch Experimente mit Mausmutanten die weitere Bedeutung von MURF 3 für die Aufrechterhaltung der Integrität der Ventrikel nach einem Myokardinfarkt. Beim Deaktivieren von MURF 3 nach einem Herzinfarkt konnte eine erhöhte Mortalitätsrate infolge linksventrikulärer Dilatation, verschlechterter Kontraktionskraft, Myozytendegeneration und anschließender Herzruptur gezeigt werden.³²

Die muskel-spezifischen RING finger Proteine etablieren sich immer mehr als wichtige Mediatoren, die Myofibrillen wie Titin mit den Mikrotubuli, Intermediärfilamenten und Kernfaktoren verbinden und damit mehrere wichtige Rollen in der Muskelphysiologie spielen.

Durch die Vernetzung untereinander und zwischen mehreren Stoffwechselwegen des Muskels ist die Erforschung der MURFs äußerst kompliziert. Diese ist aber von Bedeutung für das weitere Verständnis der Ätiologie und der Pathomechanismen im Bereich der Herz- und Muskelerkrankungen.

2 Zielsetzung der Arbeit

Eine DCM geht in bis zu 50% der Fälle mit einer familiären Häufung einher. Es sind bis heute mehr als 30 dafür ursächliche Mutationen in Genen bekannt, die vor allem für Proteine des Sarkomers, aber auch der Zellmembran, des Zytoskeletts und des Zellkerns kodieren. Sie stellen allerdings nur für einen Teil der Patienten die genetische Ursache dar, was die Suche nach weiteren, noch unbekanntem Krankheitsgenen erforderlich macht.

Die Muscle-specific RING finger Proteine 1, 2 und 3 sind wichtige Proteine, die eine bedeutende Rolle für den Aufbau, die Stabilität und den Energiestoffwechsel der Herzmuskelzelle spielen. Veränderungen in deren Genen könnten folglich zu Beeinträchtigungen dieser Funktionen führen und mit DCM assoziiert werden. Sie stellen damit interessante neue Kandidatengene für fDCM dar.

Ziel dieser Arbeit ist es, alle drei Gene in einem Kollektiv von 92 fDCM-Patienten zu analysieren. Alle Exons des jeweiligen Gens sollen direkt sequenziert und mit Referenzsequenzen aus entsprechenden Datenbanken (Ensembl, dbSNP) abgeglichen werden. Die genetische Analyse soll Aufschluss darüber geben, ob genetische Varianten – Mutationen und SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms) – im Gen auftreten und mit einer fDCM assoziiert sind. Das Hauptinteresse stellen potentielle Mutationen (seltene neue nicht-synonyme Varianten) dar, die in einem Kontrollkollektiv überprüft werden sollen.

3 Materialien und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Geräte

Name		Hersteller
ABI Prism 3730 DNA Analyzer		Applied Biosystems
Digital Graphic Printer UP D895		Sony
Eismaschine AF-100		Scotsman
Elektrophorese-Kammer Multiphor II		Pharmacia
Flachbettgelkammer Horizon 58		Gibco BRL
Fotoanlage Herolab E.A.S.Y		Herolab Enhanced Analysis System
Gelkammer Horizon [®] 58		Biometra
Mikrowelle 800		Severin
Netzteil Biometra Power Pack P25		Biometra
Picofuge		Stratagene
Pipetten	0,1 - 10 µl	Abimed, Biohit,
	2 - 20 µl	Eppendorf
	10 - 100 µl	
	20 - 200 µl	
	100 - 1000 µl	
Pipette, 8-Kanal	0,5 - 10 µl	Biozym, Biohit Proline
	2 -20 µl	Plus
Thermocycler UNO		Biometra
Thermocycler T Professional		Biometra
Peltier Thermal Cycler	PTC-100	MJ-Research
	PTC-200	
	PTC-225	

Thermostat DRI-Block DB·2A	Techne
UV-Lampe Bio Doc Analyze	Biometra
Vortex REAX 2000	Heidolph
Waage 510 - 37	Kern
Zentrifuge Rotanta 460R	Hettich Zentrifugen

3.1.2 Computerprogramm

Sequencher 4.10.1	Gene Codes Corporation
-------------------	------------------------

3.1.3 Verbrauchsmaterialien

Name	Hersteller
AB gene® PCR Plates	Thermo Scientific
96-Well Reaction Plate MicroAmp™	Applied Biosystems
96-Well Assay System MultiScreen®	Millipore
Cellophanfolie	Folia/Festa
Einführhilfe für Sephadex	GE Healthcare
Erlenmeyerkolben	Carl Zeiss Jena
Handschuhe Prima Profi; Verde	Sänger
Handschuhe Rotiprotect Nitril	Roth
Iso Freeze Rack 90	Roth
Messzylinder (50ml, 250ml)	Carl Zeiss Jena
Paket-Klebeband	Tesa
Parafilm	Roth
Multiply µStrip 0,2ml Kette	Sarstedt
Multiply 8 ^{er} Deckelkette, flach	Sarstedt
Pipettenspitzen	Biosphere

Reaktionsgefäße 2ml, 1,5ml, 0,6ml

Biozym

3.1.4 Chemikalien

Name	Hersteller
Agarose Standard	Roth
Borsäure	Roth
Bromphenolblau	Pierce
EDTA	Pierce
Ethidiumbromid	Roth
GelGreen	Biotium
Glycerin	Serva
HI-DI Formamid	Merck
HPLC-Wasser Rotisolv	Roth
Salzsäure	Merck
Sephadex™ G-50 Superfine	GE Healthcare
Tris (base)	Roth
Xylencyanol	Pierce

3.1.5 Enzyme und Nukleotide

Name	Hersteller
FastAP™ Thermosensitive Alkaline Phosphatase	Fermentas
DNA-Primerpaare*	BioTeZ
dNTP-Mix (dATP, dGTP, dCTP, dTTP)	Epicentre
Exonuklease I	BioLabs

* Die Primer-Sequenzen sind der Tabellen I, II und III im Anhang zu entnehmen.

3.1.6 Molekulargewichtsmarker

Name	Hersteller
DNA-Molekulargewichtsmarker Typ VIII (19-1114 Bp)	Fermentas

3.1.7 Kits

3.1.7.1 PCR-Kit (Strattec)

- 10x PCR-Probenpuffer(100mM Tris-HCL pH 8,3; 500mM KCl)
- MgCl₂ (25mM)
- Taq-DNA-Polymerase (5U / μ L)

3.1.7.2 BigDye Terminator Kit v 1.1 (ABI-Prism)

- BigDye Ready Reaction Mix
- 5x Sequenzierungspuffer

3.1.8 Wasser

Die Herstellung der meisten Pufferlösungen erfolgte mit HPLC-Wasser.

Für die Gelelektrophoresepufer wurde deionisiertes Wasser (dH₂O) benutzt.

3.1.9 Patientenkollektiv

Diese Studie wurde von der Ethikkommission der Charité – Universitätsmedizin Berlin bewilligt. Das zu untersuchende Patientenkollektiv bestand aus insgesamt 92 Patienten, die klinisch eine DCM hatten und nach den etablierten Kriterien alle positiv in Bezug auf eine familiäre Kardiomyopathie (fDCM) waren. Alle Patienten wurden entsprechend aufgeklärt und haben für die Untersuchungen eingewilligt. Das Kontrollkollektiv bestand aus 358 Individuen, die nicht an einer Kardiomyopathie erkrankt waren und eine normale Herzfunktion hatten.

3.2 Methoden

3.2.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR ist ein effektives Verfahren, um DNA-Fragmente *in vitro* zu amplifizieren bzw. exponentiell zu vervielfältigen. Durch die mehrfache Wiederholung von drei aufeinander folgenden Schritten – Denaturierung, Primer-Annealing und Extension-Time erfolgt die Vervielfältigung des DNA-Fragments. Beim ersten Schritt wird der DNA-Doppelstrang bei 94°C denaturiert, sodass zwei Einzelstränge entstehen. Die Forward- und Reverse-Primer hybridisieren dann bei einer Temperatur zwischen 50°C und 70°C an den komplementären 5'-Sequenzen des DNA-Einzelstrangs und bilden somit den Startpunkt für die Taq-Polymerase. In der anschließenden Extensionszeit synthetisiert diese bei 72°C einen Komplementärstrang. Dabei werden die einzelnen Nukleotide vom Primer aus, in 5'-3'-Richtung, aufeinander folgend an den Matrizenstrang angefügt, so dass ein erneuter Doppelstrang entsteht. Die PCR wird im letzten Schritt mit der Kühlung auf 4°C beendet. (Abb. 7)^{33, 34}

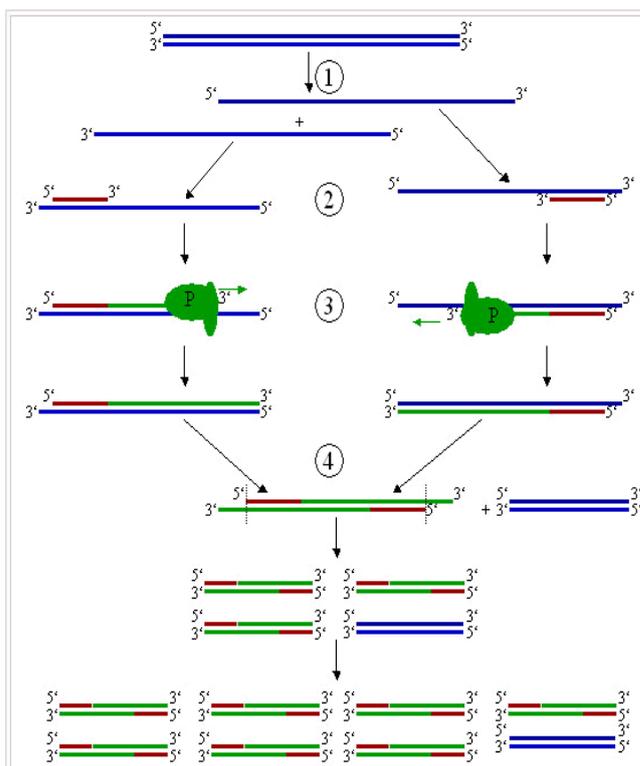


Abbildung 7: Schematische Darstellung des PCR-Zyklus.^D

①- Denaturierung;

②- Primer-Annealing;

③- Extensionszeit;

④- Nach dem ersten Zyklus entstehen zwei neue doppelsträngige DNA-Fragmente, die als Matrize für den weiteren PCR Zyklus dienen. Zu beachten ist die exponentielle Vermehrung der Produkte.

Grundlegende Komponente der PCR sind neben dem Template auch die Primer, die Polymerase, der Puffer, die MgCl₂-Lösung und die Desoxynukleotid-Triphosphate (dNTPs).

Die zu vervielfältigenden DNA-Abschnitte stellen jeweils ein Exon der MURFs Gene dar.

Nur in drei Fällen ließen sich zwei Exons als ein Fragment amplifizieren. Das war möglich, weil sowohl die Länge des einen der beiden Exons, als auch der Intronbereich dazwischen relativ kurz waren (Tab. 2). Für alle anderen Exons wurde eine PCR von den 92 Patientenproben durchgeführt.

Tabelle 2: Länge des dazwischenliegenden Intronbereichs und der beiden Exons, die als ein Fragment amplifiziert werden konnten

	Exon	Länge des ersten Exons	Länge des Intronbereichs zwischen den Exons (bp)	Länge des zweiten Exons
MURF 1	Exon 6+7	23	300	125
MURF 2	Exon 6+7	23	102	125
MURF 3	Exon 7+8	23	118	125

Die zu untersuchende DNA lag vor Beginn der Arbeit bereits als Arbeitslösung mit einer Konzentration von ca. 25 ng/µl vor. Sie wurde mittels eines Extraktionsautomaten des Typs AUTOPURE LS der Firma QIAGEN von Mitarbeitern des KardioGenetischen Labors isoliert und bei -20° C aufbewahrt.

Die verwendeten Forward- und Reverse-Primer wurden von der Firma BioTeZ Berlin-Buch GmbH mit der Hilfe des Primerdesign-Programms OLIGO® 4.0 hergestellt. Diese binden an den DNA-Einzelstrang im Intronbereich vor oder nach dem betreffenden Exon. Sie hatten eine Konzentration von 50 pmol/µl und wurden für die PCR mit HPLC-Wasser auf eine Endkonzentration von 5 pmol/µL verdünnt. Eine Liste mit allen Primern und deren Sequenzen, die dazu gehörige Annealing-Temperatur sowie PCR-Zyklenzahl befindet sich im Anhang (Tab. I, II und III).

Des Weiteren wurde der PCR Kit der Firma Stratec verwendet, der aus Taq-Polymerase, 10 x NH₄-Reaktionspuffer und MgCl₂-Lösung bestand. Der dNTPs Mix der Firma EPICENTER Biotechnologies bestand zu gleichen Teilen aus den vier Nukleotiden – 2'-Desoxyadenosin-5'-triphosphat (dATP), 2'-Desoxythymidin-5'-triphosphat (dTTP), 2'-Desoxyguanosin-5'-triphosphat (dGTP) und 2'-Desoxycytosin-5'-triphosphat (dCTP). Die Stammlösung mit einer Konzentration von c = 0; 1 mol/l wurde für die PCR mit HPLC-Wasser auf eine Arbeitslösung mit einer Konzentration von c = 20 mmol/µl verdünnt.

Es wurde ein PCR-Ansatz (Master-Mix) nach dem vorgegebenen Verwendungsprotokoll für

die Taq-Polymerase der Firma Stratec angefertigt. 24 µl davon und 1 µl DNA-Lösung wurden in die auf einem Eisblock gekühlten Reaktionsgefäße (PCR-Softstripes) pipettiert. Dazu wurde eine Negativkontrolle bestehend aus dem Master-Mix ohne DNA mitgeführt. Alle für die PCR benötigten Komponenten und deren Volumenverhältnis sowie das im Thermocycler verwendete Programm können der Tab. 3 und 4 entnommen werden.

Tabelle 3: PCR-Standard-Ansatz

Komponente	Konzentration	Volumen [µl]
dH ₂ O	-	17,5
NH ₄ Reaktionspuffer	10x	2,5
MgCl ₂	50 mmol/l	1,5
Forward-Primer	5 pmol/µl	1
Reverse-Primer	5 pmol/µl	1
dNTP Mix	25 mmol/l	0,3
Taq-DNA-Polymerase	5 U/µl	0,3
DNA	25 ng/µl	1

Tabelle 4: PCR-Programm

Schritt	Temperatur [°C]	Zeit[min]
1-Anfangsdenaturierung	94	5
2-Denaturierung	94	0,5
3-Primer-Annealing	s. Tab. I, II, III	0,5
4-Primerextension	72	1,5
5-abschließende Primerextension	72	5

3.2.2 Gelelektrophorese zur Überprüfung der PCR

Zur Überprüfung der PCR wurde eine Gelelektrophorese durchgeführt. Hierzu verwendete man ein 3%-iges Agarosegel, das aus Agarose Standard der Firma Roth und 1x TBE-Puffer hergestellt wurde. Beide Komponenten wurden in einem Erlenmeyerkolben zusammengeführt und in der Mikrowelle aufgeköcht. Nach der Zugabe vom Fluoreszenz-Farbstoff Ethidiumbromid oder GelGreen wurde das Gel in die Elektrophoresekammer gegossen. Die Auspolymerisation dauerte etwa eine Stunde.

Das Gel wurde danach mit TBE-Puffer überschichtet. In den ersten Gelkammern wurde einen mit deionisiertem Wasser im Verhältnis 1:20 verdünnten DNA-Molekulargewichtsmarker pUC Typ VIII der Firma MBI Fermentas (Abb. 8) und 2µl Auftragspuffer aufgetragen. In den anderen Gelkammern wurden jeweils 2µl PCR-Produkt mit 2µl Auftragspuffer vermischt und pipettiert. Die Elektrophorese dauerte 45 Minuten bei einer Spannung von 80V. Anschließend wurde das Gel in einem Fotometer unter UV-Licht fotografiert und ausgewertet. Dank des Fluoreszenz-Farbstoffs wurden die DNA-Fragmente in Form von Banden sichtbar. Durch den Vergleich mit dem Molekulargewichtsmarker konnte deren Größe abgeschätzt werden.

Die Zusammensetzung von dem 5x TBE-Puffer, dem Agarosegel und dem Auftragspuffer kann den darunterliegenden Tabellen 5, 6 und 7 entnommen werden. Zur Herstellung des 1 x TBE-Puffers wurde der 5 x TBE-Puffer im Verhältnis 1:5 mit deionisiertem Wasser verdünnt.

Tabelle 5: 5 x TBE-Puffer

Komponente	Volumen
Tris (Base)	54g
Borsäure	27,5g
0,5M EDTA-Lösung	20ml
dH ₂ O	1000ml

Tabelle 6: 3%iges Agarosegel

Komponente	Volumen
Agarose	3g
1 x TBE-Puffer	100ml
Ethidiumbromid/GelGreen	5µl

Tabelle 7: Auftragspuffer

Komponente	Menge
Glycerin	3ml
HPLC-Wasser	7ml
Bromphenolblau	0,025g
Xylencyanol	0,025g

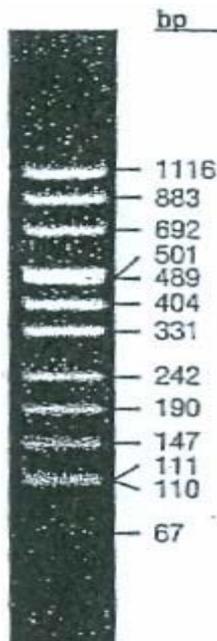


Abbildung 8: DNA-Molekulargewichtsmarker pUC Typ VIII

3.2.3 Probleme bei der PCR

Die Gelelektrophorese ergab Banden bei den Negativkontrollen von fünf Exons, was zunächst als eine Verunreinigung interpretiert wurde. Da nach erfolgter Wiederholung der PCR jedoch die gleichen Ergebnisse konstatiert werden konnten, entschied man sich, die gleichen Primer neu zu bestellen. Um sie zu testen, wurde zunächst eine Gradienten-PCR durchgeführt. Dabei werden gleiche PCR-Ansätze und Test-DNA unter verschiedene Temperaturen zwischen 50°C und 70°C im Gradienten-Programm des Thermocyclers amplifiziert. Die günstigste Temperatur wurde für die darauffolgende PCR des Exons ausgewählt. Die Negativkontrollen mit den neuen Primern ergaben keine Auffälligkeiten.

3.2.4 Enzymatische Aufreinigung der PCR Produkte

Nach erfolgreicher PCR wurden die DNA-Fragmente enzymatisch aufgereinigt, damit nicht gebundene Primer und dNTPs entfernt werden können. Dazu wurden zwei Enzyme verwendet - Exonuklease 1 und Shrimp Alkaline Phosphatase. Es wurde ein Master-Mix hergestellt (Tab. 8) und dazu das 7µl PCR-Produkt eingemischt. Die Aufreinigung erfolgte im Thermocycler für 30 Minuten bei 37°C und anschließend für 15 Minuten bei 85°C.

Die Sequenzierprodukte wurden bei -20°C aufbewahrt oder gleich nach der Cyclesequencing aufgereinigt. Dazu verwendete man eine 96 Well-Plate des MultiScreen[®] Assay Systems. Die mit „Sephadex[™] G-50 Superfine“ und 300 μl HPLC-Wasser pro Well über eine Nacht bei 4°C gequollene Platte wurde 5 Minuten lang zentrifugiert, wiederum mit 150 μl HPLC-Wasser pro Well befüllt und anschließend wieder für 5 Minuten zentrifugiert. Das Wasser wurde dabei in einer darunterliegenden Abfall-Platte aufgefangen. Diese wurde danach durch ein Sequenzierwell, das zuvor mit 13 μl HiDi-Formamid pro Well gefüllt worden war, ersetzt. Im letzten Schritt wurde jeweils 10 μl Sequenzierprodukt in der 96 Well-Plate pipettiert und eine letzte fünfminütige Zentrifugation vorgenommen. Die gereinigten Produkte landen dadurch in das Sequenzierwell und wurden dann bei -20°C gelagert.

Tabelle 9: Komponente des Master-Mixes für die Cyclesequencing

Komponente	Volumen [μl]
BigDye Ready Reaction	0,5
5 x Sequenzierungspuffer	1,75
Forward- oder Reverse-Primer	1
HPLC-Wasser	4,75
PCR-Produkt	2

Tabelle 10: Programm für die Cyclesequencing

Schritt	Temperatur [$^{\circ}\text{C}$]	Zeit [min]
1-Anfangsdenaturierung	96	1:00
2-Denaturierung	96	0:10
3-Primerhybridisierung	50	0:30
4-Primerextension	60	4:00
Wiederholung Schritt 2-4	x25	

3.2.6 Auswertung der Sequenzierung

Die DNA-Fragmente wurden in einem automatischen Sequenzer ABI Prism 3730 analysiert. Die Sequenzdaten wurden in Elektropherogrammen dargestellt, die mit Hilfe des Computerprogramms Sequencher 4.10.1 ausgewertet wurden. Die Sequenzierungen wurden dabei mit den Referenzsequenzen verglichen, die aus der Ensembl-Datenbank stammen und

den Tabellen IV, V und VI im Anhang zu entnehmen sind. Die Position der gefundenen Varianten wurde in der cDNA ermittelt. Es wurde in entsprechenden Datenbanken (Ensembl, dbSNP) nachgeschlagen, ob diese Varianten schon bekannt sind.

3.2.7 Anmerkung

Der hergestellte Ansatz für die PCR und für die Sequenzierung wurde immer intensiv mit Hilfe eines Vortex-Gerätes gemischt und mit einer Picofuge zentrifugiert. Das Arbeiten mit Enzymen wurde immer auf Eis durchgeführt.

4 Ergebnisse

4.1 PCR - Probleme und Ergebnisse

Bei der Überprüfung der PCR-Ergebnisse mittels Gelelektrophorese stellte sich heraus, dass bei MURF 1 – Exon 2, MURF 2 – Exon 2 und 4 und MURF 3 – Exon 4 und 6 in den Negativkontrollen klare Banden mit der Länge des PCR-Produktes zu beobachten waren (Abb. 10). Als Ursache wurde eine Kontamination angenommen. Folglich wurde die PCR unter Beachtung von saubereren Arbeitsbedingungen, von einer genauen Einhaltung der Zusammensetzung des Ansatzes und von präzisiertem Pipettieren wiederholt.

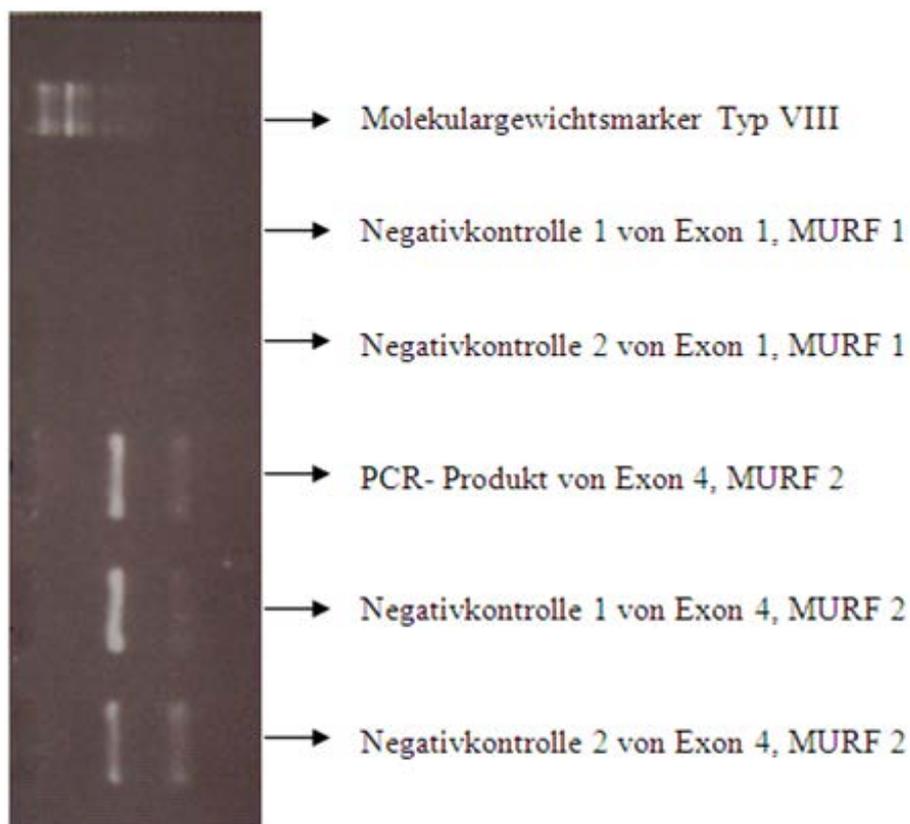


Abbildung 10: Klare Bande in der Negativkontrolle bei der Gelelektrophorese am Beispiel des Exons 4, MURF 2. Zum Vergleich: saubere Negativkontrollen von MURF 1, Exon 1.

Da die Negativkontrollen wieder positiv waren, wurde angenommen, dass die Primer degradiert sind und nicht gut funktionieren. So wurden die gleichen Primer neu bestellt. Zu Testzwecken fand eine Gradienten-PCR statt. Damit konnte die schon ermittelte optimale Annealingtemperatur und Zyklenzahl überprüft werden. Es wurde eine Temperaturspanne von

50°C bis 70°C und die schon verwendete Zyklenzahl ausgewählt. Die Gelelektrophorese zeigte unauffällige Negativkontrollen bei allen 5 Exons auf. Mehrere Temperaturen, inklusive der schon vorgegebenen, erwiesen sich für das jeweilige Exon als günstig. Es wurde an den alten PCR-Bedingungen festgehalten. Alle Fragmente konnten dann problemlos mit den neu bestellten Primerpaaren amplifiziert werden. (Abb. 11 und 12)

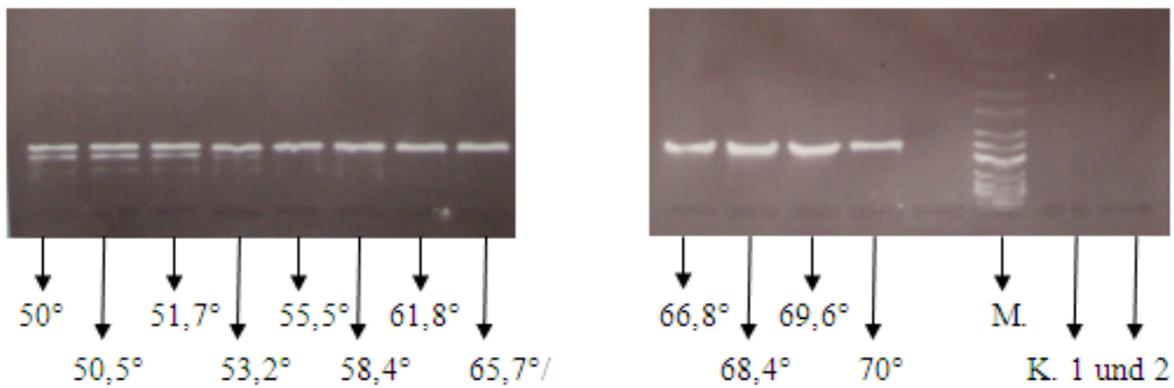


Abbildung 11: Ergebnis der Gradienten-PCR am Beispiel von Exon 2, MURF 2. Die Annealingtemperaturen (°C) sind eingegeben. Als günstig ergab sich die Temperaturspanne zwischen 65,7°C bis 70°C.

(Legende: M. – Molekulargewichtsmarker Typ VIII; K. 1 und 2 - Negativkontrollen 1 und 2)

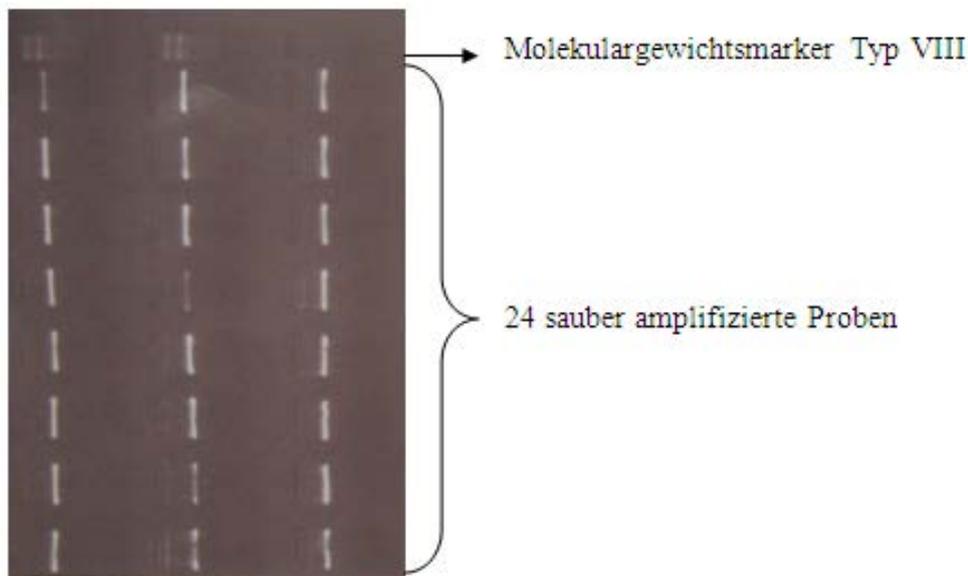


Abbildung 12: Gelelektrophoreseergebnisse zur Überprüfung der PCR am Beispiel von Exon 2, MURF 2. Ein sauberes PCR-Produkt ist vorhanden. (Annealingtemperatur 68°C, 38 Zyklen).

Alle Exons der MURF-Gene konnten mit dem Standard-PCR-Ansatz und ohne weitere Optimierungsschritte gut amplifiziert werden. Exon 6 und 7 von MURF 1, Exon 6 und 7 von MURF 2 sowie Exon 7 und 8 von MURF 3 ließen sich als ein Fragment vervielfältigen. Alle anderen Exons wurden einzeln amplifiziert. Die Fragmentlänge der PCR-Produkte verglichen mit dem Marker VIII entsprach der vorgegebenen Länge.

Ein optimales PCR-Ergebnis war entscheidend für die weitere erfolgreiche Sequenzierung und Auswertung der Proben.

4.2 Sequenzierungsergebnisse

Alle Exons von MURF 1, 2 und 3 konnten in den 92 Patientenproben erfolgreich sequenziert werden. Die Auswertung erfolgte mittels des Computerprogramms Sequencher 4.10.1.

Die gefundenen Varianten werden in vier Gruppen geteilt – synonym oder nicht-synonym und dann jeweils bekannt oder neu. Bei synonymen Varianten kodiert die Sequenz von drei Nukleinbasen (Codon) für die gleiche Aminosäure. Es handelt sich um einen so genannten stillen SNP oder stille Mutation und es findet kein Aminosäureaustausch statt. Bei einer nicht-synonymen Variante (missense Variante) erfolgt ein Aminosäurewechsel, was eine Veränderung des Proteins und funktionelle Beeinträchtigungen nach sich ziehen kann.

Die gefundenen nicht-synonymen neuen Varianten sind von besonderem Interesse, da sie potentielle Mutationen darstellen können. Die bereits in den Datenbanken existierenden Varianten (dbSNP build 135; März 2012) wurden mit der zugehörigen Nummer (SNP ID) vermerkt. Die verwendeten Bezeichnungen entsprechen der etablierten Nomenklatur.³⁵

4.3 Gefundene Varianten in MURF 1

Für die meisten Ansätze wurde der Forward-Primer des jeweiligen Exons verwendet. Bei 10 Proben des Exons 1 waren die Sequenzierungsergebnisse am Beginn des Fragments unleserlich. Es wurde deswegen zusätzlich eine weitere Sequenzierung dieser Proben mit dem Reverse-Primer vorgenommen. Exons 6 und 7 konnten als ein Fragment sequenziert werden. Aufgrund der schlechten Qualität der PCR-Produkte oder aufgrund von Störungen des Sequenziergeräts waren manche Proben in einigen Fällen nicht auswertbar. Eine erneute Sequenzierung wurde dann nur für diese Proben vorgenommen. Schließlich hat die

Sequenzierung von allen 9 Exons von MURF 1 zu sehr gut auswertbaren Ergebnissen geführt.

4.3.1 Synonyme bekannte Varianten

Exon 1

Die in nur einer Patientenprobe gefundene Variante im Exon 1 führt zu einem Austausch auf Position 135 der cDNA – Cytosin wird gegen Guanin ausgetauscht (c.135G>C). Da beide Codons CGG und CGC für Arginin kodieren, ist dieser heterozygote SNP, der Codon 45 in der cDNA betrifft, synonym (Arg45Arg). Er ist unter der Nummer rs61760891 beschrieben.

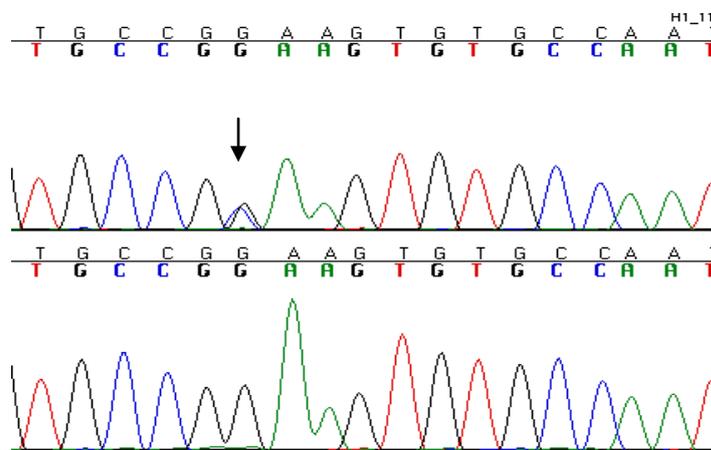


Abbildung 13: Sequenzausschnitt des Chromatogramms im Programm Sequencher 4.10.1 für MURF 1, Exon 1. Oben heterozygoter SNP c.135G>C. Zum Vergleich unten eine Wildtyp-Sequenz. Der SNP ist mit einem Pfeil gekennzeichnet.

Exon 2

Im Exon 2 wurde an Aminosäureposition 89 ein heterozygoter synonymer SNP identifiziert, der für Valin kodiert (c.267G>T; Val89Val). Er trat in 11 Proben auf und stellt damit eine häufige Variante dar. Der SNP ist unter der Nummer rs35123100 beschrieben und mit einer Häufigkeit von 2,8% in der normalen Bevölkerung in dbSNP zu finden.

Exon 3

Eine heterozygote Variante in Exon 3 trat in 2 Proben auf. Es wurde im Codon 375 ein Nukleotidaustausch von Cytosin nach Thymin beobachtet (c.375C>T), der auf Aminosäureebene keine Änderung verursacht. Die SNP ID ist rs144196126.

Tabelle 11: Gefundene synonyme bekannte Varianten in MURF 1

Exon	Position in cDNA	Aminosäure-austausch	SNP ID	Allele	Codon	homo-/heterozygot	Anzahl der Proben mit der Variante (%)
1	c.135G>C	Arg45Arg	rs61760891	G/C	CGG/CGC	heterozygot	1 (0,5%)
2	c.267G>T	Val89Val	rs35123100	G/T	GTG/GTT	heterozygot	11 (6%)
3	c.375C>T	His125His	rs144196126	C/T	CAC/CAT	heterozygot	2 (1,1%)

Es wurden keine neuen synonymen Varianten in den 92 untersuchten Proben gefunden.

4.3.2 Nicht-synonyme bekannte Varianten

Exon 5

Bei der Auswertung von Exon 5 wurden zwei nicht-synonyme bekannte Varianten gefunden.

Bei der ersten Variante handelte es sich um einen SNP auf Nukleotidposition 709, der häufig vorkommt und in 38 Proben festgestellt wurde. Durch den Austausch A>G wird auf Aminosäureebene Lysin durch Glutaminsäure ersetzt (Lys237Glu). Die SNP ID lautet rs2275950.

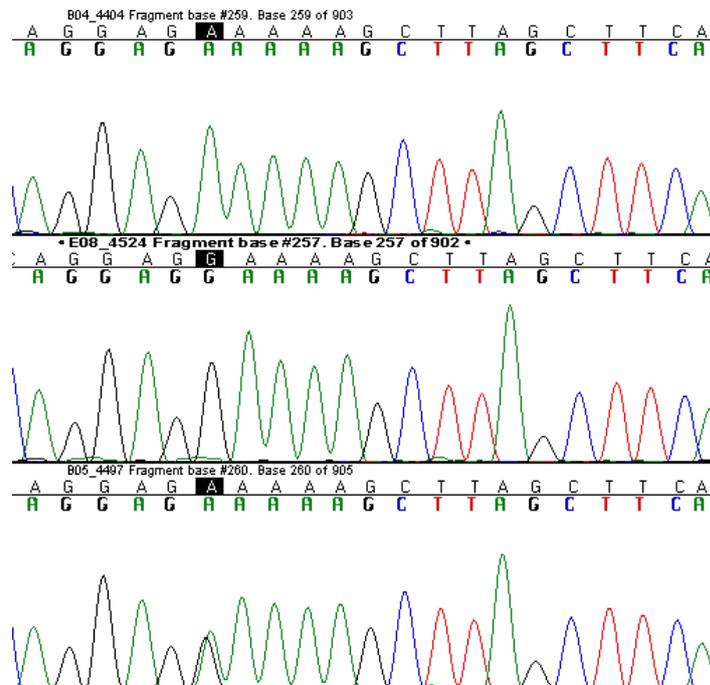


Abbildung 14: Sequenzausschnitt des Chromatogramms im Programm Sequencher 4.10.1 für MURF 1, Exon 5. Es werden untereinander eine Wildtyp-Sequenz, ein homozygoter und ein heterozygoter SNP angezeigt. Die betroffene Base ist schwarz markiert.

Die zweite Variante, die festgestellt wurde, liegt auf Position 805 der cDNA und führt zu einem Austausch von G>A. Dadurch wird Lysin statt Glutaminsäure in das Protein eingebaut (Glu269Lys). Dieser heterozygote SNP mit der Nummer rs61749355 war in drei Proben zu finden.

Tabelle 12: Gefundene nicht-synonyme bekannte Varianten in MURF 1

Exon	Position in cDNA	Aminosäure-austausch	SNP ID	Allele	Codon	homo-/heterozygot	Anzahl der Proben mit der Variante (%)
5	c.709A>G	Lys237Glu	rs2275950	A/G	<u>A</u> AA/ <u>G</u> AA	heterozygot homozygot	34 (18,5%) 4 (2,2%)
	c.805G>A	Glu269Lys	rs61749355	G/A	<u>G</u> AG/ <u>A</u> AG	heterozygot	3 (1,6%)

Es wurden keine Varianten in den Exons 4, 6, 7, 8 und 9 gefunden. Die Sequenzierungen waren gut lesbar und ergaben keinen Unterschied zu den Referenzsequenzen.

4.3.3 Sequenzierungsfehler

Es wurde beim Auswerten von Exon 4 eine neue homozygote Variante gefunden. Es handelt sich um die Position 561 in der cDNA. Da Cytosin durch Thymin ersetzt wurde, bedeutete das, dass die in Position 187 neutrale Aminosäure Threonin durch die hydrophobe Aminosäure Isoleucin ausgetauscht wurde. Diese interessante Abweichung konnte aber durch eine erneute Amplifikation und Forward- und Reverse-Sequenzierung nicht bestätigt werden (Abb. 15).

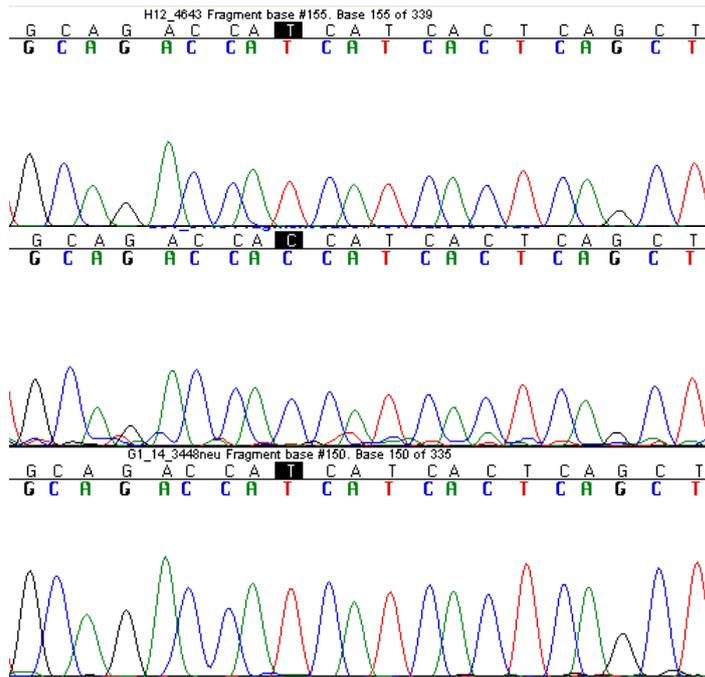


Abbildung 15: Sequenzausschnitt des Chromatogramms im Programm Sequencher 4.10.1 für MURF 1, Exon 4. Die nicht-synonyme homozygote neue Variante konnte bei einer erneuten Sequenzierung nicht bestätigt werden. Es werden untereinander eine Wildtyp-Sequenz, die erste und die zweite Sequenzierung der Probe angezeigt. Zu beachten ist das schlechte Signal/Hintergrund-Verhältnis bei der ersten Sequenzierung der Probe, das offensichtlich zu dem Fehlergebnis geführt hat. Die betroffene Base ist schwarz markiert.

4.4 Gefundene Varianten in MURF 2

Für die Exons 2, 5, 6, 7, 8, 10 und 11 wurde bei der Sequenzierung der Forward-Primer verwendet, wobei Exons 6 und 7 als ein Fragment sequenziert werden konnten. Am Beginn von Exon 3 und 4 war die Sequenz unleserlich. Es wurde deswegen zusätzlich eine weitere Sequenzierung mit dem Reverse-Primer vorgenommen. Exons 1 und 9 wurden nur anhand der Reverse Sequenzierung ausgewertet. Aufgrund von der schlechten Qualität der PCR-Produkte oder aufgrund von Störungen des Sequenziergeräts war die Sequenz mancher Proben nicht auswertbar. Eine erneute Sequenzierung wurde nur für diese vorgenommen. Darüber hinaus gab es auch manche Stellen in der Sequenz vom Exon 5, die bei allen Proben schwer lesbar waren. Es wurde angenommen, dass es sich um Signalstörungen und unerwünschtes Rauschen handelt (Abb. 16). Schließlich kam es zu einer sauberen Sequenzierung und gut lesbaren Ergebnisse aller Exons in dem Kollektiv von den 92 Patientenproben.

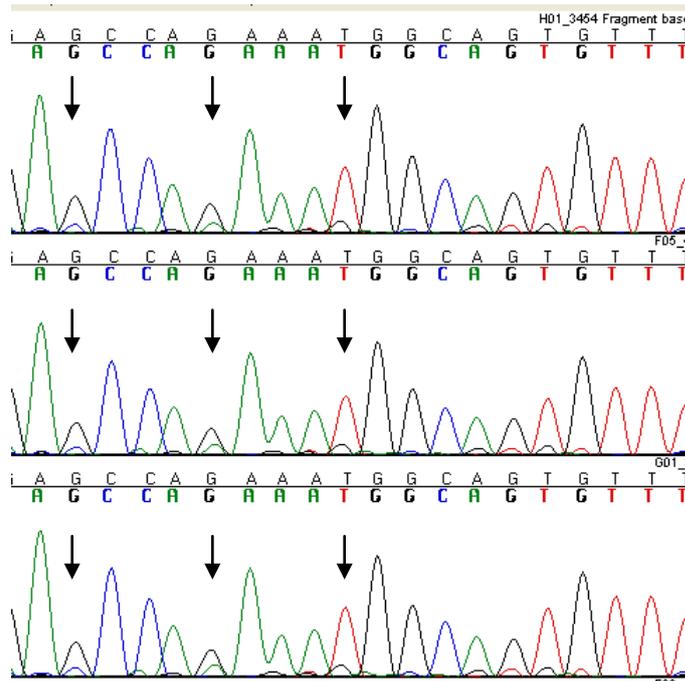


Abbildung 16: Sequenzausschnitt des Chromatogramms im Programm Sequencher 4.10.1 für MURF 2, Exon 5. Die Signalstörungen befinden sich an der gleichen Stelle bei allen ausgewerteten 92 Sequenzen. Die auffälligen Stellen sind mit einem Pfeil gekennzeichnet.

4.4.1 Synonyme bekannte Varianten

Exon 7

Die gefundene Variante in Exon 7 war auf Position 867 der cDNA, bei der Guanin gegen Adenin ausgetauscht wurde. Dieser bekannte SNP (rs61738600) ist heterozygot synonym und ändert demzufolge die 289 Aminosäure Serin nicht. Er ist gemäß der Ensembl-Datenbank der am häufigsten anzutreffende synonyme SNP in MURF 2 mit einer Häufigkeit von 6,6%. In unserer Kohorte kam er in 10 Proben vor.

Tabelle 13: Alle gefundenen synonymen bekannten Varianten in MURF 2

Exon	Position in cDNA	Aminosäure-Austausch	SNP ID	Allele	Codon	homo-/heterozygot	Anzahl der Proben mit der Variante (%)
7	c.867G>A	Ser289Ser	rs61738600	G/A	TC <u>G</u> /TC <u>A</u>	heterozygot	10 (5,4%)

4.4.2 Nicht-synonyme bekannte Variante

Exon 3

Die in einer Probe gefundene nicht-synonyme Variante auf Position 418 der cDNA in Exon 3 weckte großes Interesse, da sie zur Zeit der Durchführung der Versuche in den Datenbanken nicht zu finden war. Es handelte sich um den Basenaustausch Guanin gegen Adenin und somit um den Einbau von Lysin statt Glutaminsäure in die Aminosäuresequenz. Es wurde davon ausgegangen, dass diese Variante neu ist und eine potentielle Mutation darstellen könnte. Durch Reverse-Sequenzierung, erneute PCR und Sequenzierung in beiden Richtungen konnte die Variante in der Probe bestätigt werden. Zur anschließenden Überprüfung wurde ein Kontrollkollektiv von 358 gesunden Patienten herangezogen. Eine Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus (RFLP) Analyse konnte nicht durchgeführt werden, weil die Variante keine passende Restriktionsschnittstelle ändert. Folglich erfolgte die Untersuchung mittels PCR, Sequenzierung und Auswertung der Ergebnisse. Die Variante konnte in keiner der Kontrollproben gefunden werden.

Kurz vor Fertigstellung der Arbeit stellte sich heraus, dass die Variante in den neuen Datenbanken zu finden ist und als SNP unter der Nummer rs138811034 beschrieben ist.

Exon 8

Es wurde im Exon 8 ein nicht-synonymer häufig vorkommender SNP gefunden. Durch einen heterozygoten Nukleotidaustausch von A>G in der DNA wird auf Aminosäureebene Lysin durch Arginin ersetzt. Diese bekannte Variante mit der Nummer rs7843605 ist mit einer Allelfrequenz von 19,3% in den Datenbanken zu finden und trat in 24 Proben auf.

Tabelle 14: Gefundene nicht-synonyme bekannte Varianten in MURF 2

Exon	Position in cDNA	Aminosäure-austausch	SNP ID	Allele	Codon	homo-/heterozygot	Anzahl der Proben mit der Variante (%)
3	c.418G>A	Glu140Lys	rs138811034	G/A	<u>G</u> AA/ <u>A</u> AA	heterozygot	1 (0,5%)
8	c.1028A>G	Lys343Arg	rs7843605	A/G	<u>A</u> AA/ <u>A</u> GA	heterozygot	24 (13%)

Es wurden keine nicht-synonymen neuen Varianten gefunden. Exons 1, 2, 4, 5, 6, 9, 10 und 11 zeigten keine Auffälligkeiten. Beim Vergleich mit den Referenzsequenzen wurden keine Varianten gefunden.

4.4.3 Sequenzierungsfehler

Eine synonyme neue Variante tauchte im Exon 8 auf Position 1203 der cDNA auf. Es handelte sich nur um eine Probe, bei der Cytosin gegen Thymin ausgetauscht wurde. Diese Variante konnte aber durch die neuen PCR und Sequenzierungen der Probe nicht bestätigt werden und wurde als Fehler des Sequenziergerätes interpretiert.

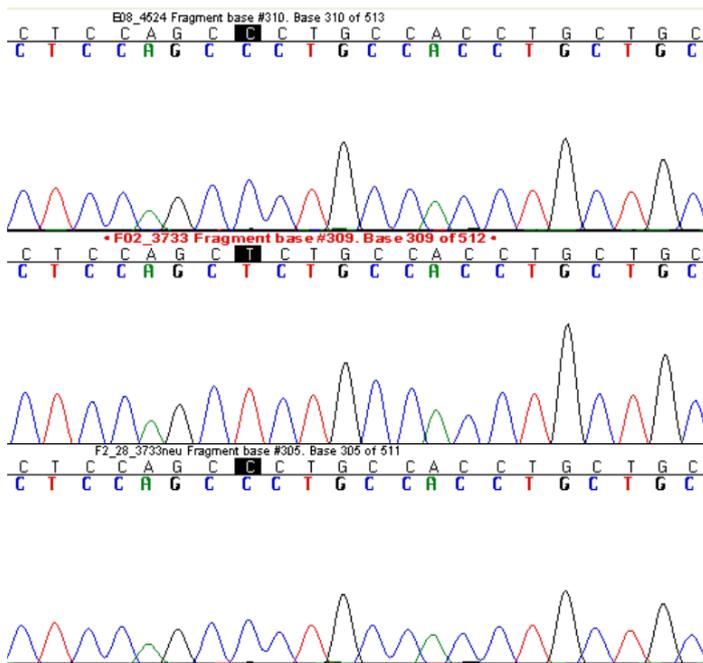


Abbildung 17: Sequenzausschnitt des Chromatogramms im Programm Sequencher 4.10.1 für MURF 2, Exon 8. Die neue synonyme homozygote Variante konnte bei den wiederholten Sequenzierungen nicht bestätigt werden. Es werden untereinander eine Wildtyp-Sequenz, die erste und die zweite Sequenzierung der Probe angezeigt. Die betroffene Base ist schwarz markiert.

4.5 Gefundene Varianten in MURF 3

Für die meisten Exons von MURF 3 wurde der Forward-Primer bei der Sequenzierung verwendet. Es gab bei den Exons 1 und 2 mehrere Proben, die vor allem am Anfang ein sehr schlechtes Signal/Hintergrund-Verhältnis aufwiesen, so dass auch eine Reverse-Sequenzierung dieser vorgenommen wurde. Dasselbe galt auch für Exon 6, bei dem aber alle Sequenzierungsergebnissen am Beginn des Fragmentes unleserlich waren. Exon 5 wurde nur anhand der Reverse-Sequenzierung ausgewertet. Exons 7 und 8 konnten als ein Fragment in

beiden Richtungen sequenziert werden, wobei Exon 7 anhand der Reverse- und Exon 8 anhand der Forward-Sequenzierung ausgewertet wurde. In einigen Fällen war die Sequenz mancher Proben unlesbar. Eine erneute Sequenzierung wurde dann nur für diese vorgenommen. Darüber hinaus gab es auch manche Stellen in der Sequenz, z. B. im Exon 1, die bei allen Proben schwer lesbar waren. Es wurde davon ausgegangen, dass es sich um unerwünschtes Rauschen handelte (Abb. 18). Es konnte eine gut auswertbare Sequenzierung für alle 9 Exons erfolgen.

4.5.1 Synonyme bekannte Varianten

Exon 1

Es wurde eine synonyme Variante auf Nukleotidposition 159 der cDNA gefunden. Es handelt sich um Codon 53, bei dem Cytosin durch Thymin ersetzt wurde. Hierbei ändert sich die Aminosäure Asparaginsäure nicht. Der SNP ist bereits bekannt (rs33994928) und mit einer Häufigkeit von 2,7% anzutreffen. Von den 92 Proben waren 9 betroffen, wobei 8 heterozygot und nur eine homozygot waren.

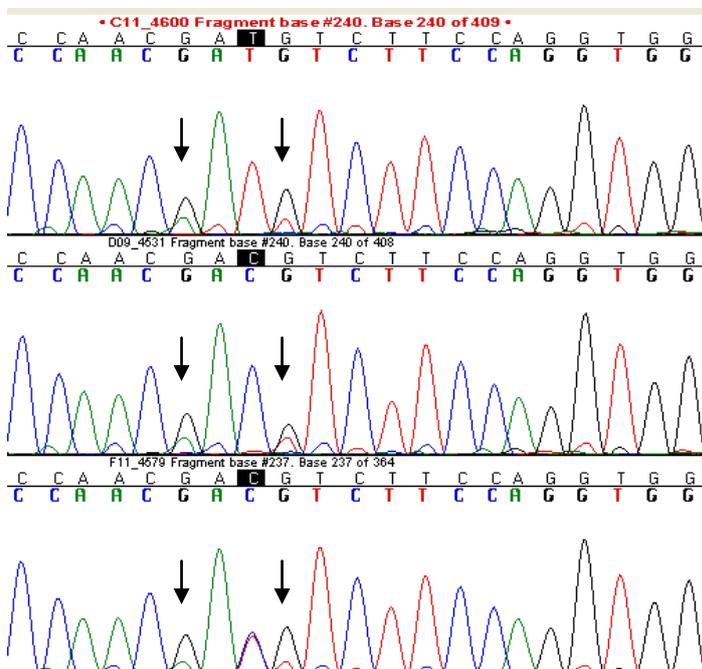


Abbildung 18: Sequenzausschnitt des Chromatogramms im Programm Sequencher 4.10.1 für MURF 3, Exon 5. Es werden untereinander eine Wildtyp-Sequenz, ein homozygoter und ein heterozygoter SNP angezeigt. Die betroffene Base ist schwarz markiert. Zu beachten sind die Signalstörungen, die an gleicher Stelle bei allen ausgewerteten 92 Sequenzen auftraten; hier am Beispiel von den 3 Proben mit einem Pfeil gekennzeichnet.

Tabelle 15: Gefundene synonyme bekannte Varianten in MURF 3

Exon	Position in cDNA	Aminosäure-austausch	SNP ID	Allele	Codon	homo-/heterozygotie	Anzahl der Proben mit der Variante (%)
1	c.159C>T	Asp53Asp	rs33994928	C/T	<u>GAC</u> / <u>GAT</u>	heterozygot homozygot	8 (4,35%) 1 (0,54%)

Es wurden sowohl keine neuen synonymen als auch keine nicht-synonymen Varianten in den Exons von MURF 3 gefunden. Außer Exon 1 waren alle anderen Exons (2 bis 9) unauffällig.

4.6 Zusammenfassung der Ergebnisse

In der darunterliegenden Tabelle 16 sind die festgestellten Varianten angeführt. Die prozentuale Häufigkeit der auftretenden Veränderung ist angegeben. Dabei handelt es sich zum einem um den in dem fDCM-Kollektiv im Rahmen dieser Arbeit berechneten Wert und sowie zum anderen um die in den entsprechenden Datenbanken (dbSNP build 135; März 2012) angegebene Allelfrequenz (minor allele frequency - MAF) in der Bevölkerung. Es ist ersichtlich, dass alle SNPs bekannt sind und der Großteil dieser in der Bevölkerung weit verbreitet ist.

Tabelle 16: Gefundene Varianten und deren Allelfrequenz in MURF 1, 2 und 3 im Kollektiv von 92 Patienten mit fDCM.

	Exon	Variante und SNP ID	Position in cDNA	Aminosäure-austausch	Frequenz des selteneren Allels in dem Patienten-kollektiv [%]	Frequenz des selteneren Allels in der Bevölkerung (MAF) [%]
MURF 1	1	<u>Syn. SNP</u> rs61760891	c.135G>C	Arg45Arg	0,5	0,03
	2	<u>Syn. SNP</u> rs35123100	c.267G>T	Val89Val	6	2,8
	3	<u>Syn. SNP</u> rs144196126	c.375C>T	His125His	1,1	0,03
	5	<u>Nicht-syn. SNP</u> rs2275950 rs61749355	c.709A>G c.805G>A	Lys237Glu Glu269Lys	20,7 1,6	19,8 0,09
MURF 2	3	<u>Nicht-syn. SNP</u> rs138811034	c.418G>A	Glu140Lys	0,5	0,03
	7	<u>Syn. SNP</u> rs61738600	c.867G>A	Ser289Ser	5,4	6,6
	8	<u>Nicht-syn. SNP</u> rs7843605	c.1028A>G	Lys343Arg	13	19,3
MURF 3	1	<u>Syn. SNP</u> rs33994928	c.159C>T	Asp53Asp	4,9	2,7

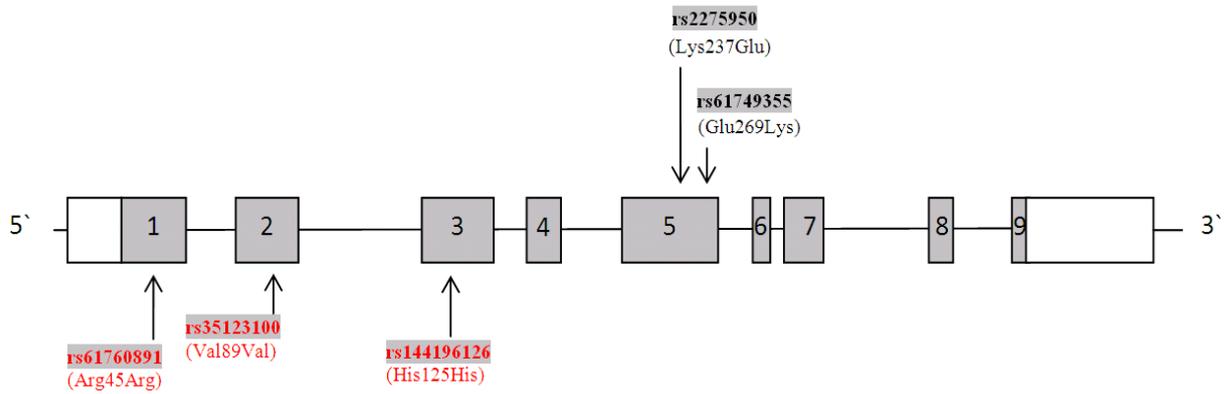


Abbildung 19: Überblick über die im Rahmen dieser Arbeit gefundenen Varianten in MURF 1

Nicht-synonyme Varianten sind schwarz hinterlegt, synonyme Varianten - rot.

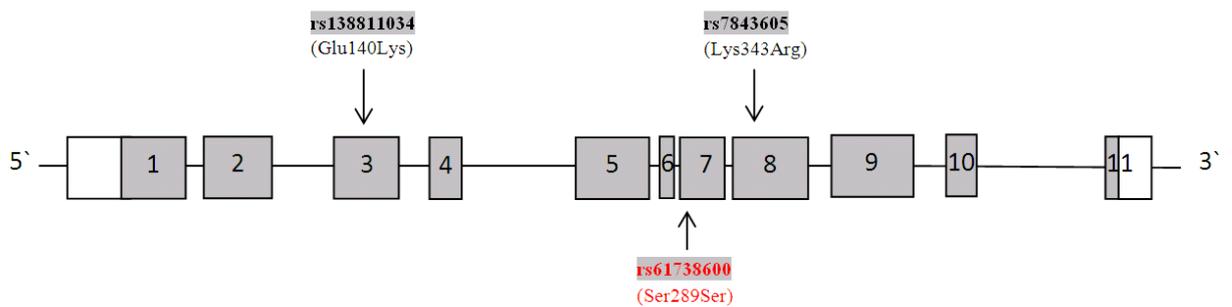


Abbildung 20: Überblick über die im Rahmen dieser Arbeit gefundenen Varianten in MURF 2

Nicht-synonyme Varianten sind schwarz hinterlegt, synonyme Varianten - rot.

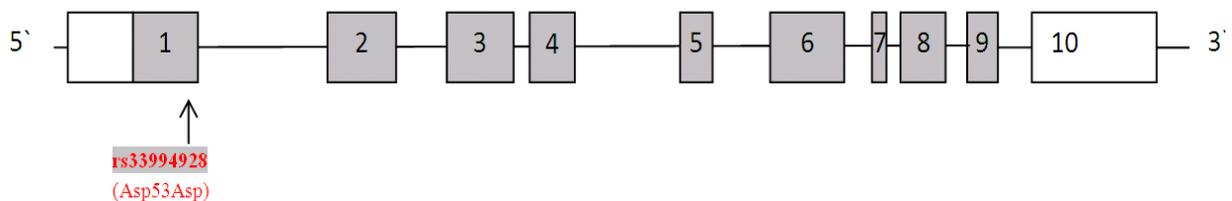


Abbildung 21: Überblick über die im Rahmen dieser Arbeit gefundenen Varianten in MURF 2

Die gefundene synonyme Variante ist rot hinterlegt.

5 Diskussion

5.1 Überblick

Das Ziel dieser Arbeit war die genetische Analyse der drei Gene MURF 1, MURF 2 und MURF 3 in einem Kollektiv von 92 Patienten mit fDCM. Dabei sollten alle gefundenen genetischen Varianten überprüft werden und daraus Schlussfolgerungen über eine mögliche Assoziation der MURFs zu der Erkrankung gezogen werden.

Mutationen in bestimmten Muskelproteinen gelten als wichtige Ursache für Kardiomyopathien. Bisher wurden mehr als 30 Gene entdeckt, die für die Entwicklung einer fDCM verantwortlich sind. Es handelt sich um kardiale Proteine, die sich im Sarkomer, im Zytoskelett, im Zellkern oder auch in der Zellmembran befinden. Auf der Suche nach weiteren möglichen Krankheitsgenen wurde die Aufmerksamkeit auf die Familie der MURFs gelegt. RING Proteine im Allgemeinen sind an grundlegenden Prozessen in der Zelle wie Ubiquitination, Onkogenese, Apoptose, peroxisomalen Biogenese und Transkriptionsrepression beteiligt. Für viele von denen wurde bereits bewiesen, dass sie in der Pathogenese vieler Krankheiten involviert sind.³⁶ Bei den MURFs sind jedoch bis heute keine Mutationen bekannt, die mit einer Erkrankung verbunden sind. Die drei Proteine sind für eine regelhafte Muskelfunktion äußerst wichtig: sie agieren als Bindeglieder zwischen mehreren Muskelstoffwechselwegen und sind Schlüsselkomponenten bei der Ubiquitinierung, beim Kerntransport und bei der Genexpression. Mit deren zentraler Rolle bei der Aufrechterhaltung der Herzmuskelstruktur stellen sie somit interessante neue Kandidatengene für eine DCM dar.

5.2 Methoden

Bei der Durchführung der genetischen Analyse wurden etablierte, effiziente Methoden verwendet. Mit Hilfe von PCR und von direkter Sequenzierung konnten alle Exons der 3 Gene der MURF-Familie in den 92 Proben ausgewertet werden. Es war eine schnelle und erfolgreiche Durchführung der einzelnen Schritte möglich. Alle Fragmente konnten ohne zusätzliche Optimierungsschritte amplifiziert werden, was anhand der eindeutigen Banden in der Gelelektrophorese zu beobachten war (siehe dazu Abb. 12 als Beispiel). Die aufgetretene Problematik mit den positiven Negativkontrollen bei einigen Exons, ließ sich durch die Bestellung neuer Primer beseitigen. Durch eine Forward- oder Reverse-Sequenzierung oder durch eine Kombination von beiden kam es schließlich zu genauen und gut auswertbaren

Ergebnissen. Die verwendeten Referenzsequenzen und die genetischen Daten wurden entsprechenden Datenbanken entnommen (Ensembl; dbSNP).

5.3 Mögliche Varianten

Es ist wichtig zu unterscheiden, ob eine Veränderung (Variante) in der Sequenz vorliegt und wenn ja, ob es sich um einen Polymorphismus oder um eine potentielle Mutation handelt.

Der Einzelnukleotid-Polymorphismus oder SNP (SingleNucleotidePolymorphism) entspricht einem einzelnen Basenaustausch in der DNA, der definitionsgemäß mit einer Häufigkeit (Allelfrequenz) mehr als 1% in der Population vorkommt. Das menschliche Genom besteht aus etwa 10 Millionen Polymorphismen, die ungefähr etwa alle 600 bp auftreten.^{37, 38} SNPs stellen somit die häufigsten Genvarianten dar und bilden die Grundlage der interindividuellen Unterschiede.³⁹ Sie können sowohl im kodierenden als auch im nicht-kodierenden Teil der DNA liegen und entweder synonym oder nicht-synonym sein. Die im kodierenden Bereich liegenden nicht-synonymen SNPs führen zu einem Aminosäureaustausch, der die Struktur und die Funktion des Proteins beeinflussen kann. Die Gruppe von Sunyaev et al. schätzte, dass dabei in 20 % der Fälle mit einer schädigenden Wirkung auf das Protein zu rechnen ist.⁴⁰ Der Datensatz zeigt, dass solche SNPs deutlich geringere Allel-Frequenz haben und meist alleine keine Erkrankung auslösen können. So wird mit dem in 2008 gestarteten 1000-Genome-Projekt erzielt, möglichst alle Variationen des menschlichen Erbguts mit einer Allelfrequenz des selteneren Allels von > 0.5% zu erfassen. Es wird vermutet, dass Varianten mit dieser oder geringerer Häufigkeit eine Bedeutung als Suszeptibilitätsfaktoren für Krankheiten haben und zu einer deutlichen Risikoerhöhung bei einzelnen Personen führen.^{37, 38, F} Eine Reihe von Assoziationen von bestimmten Polymorphismen mit verschiedenen Erkrankungen ist im Laufe der letzten Jahre allerdings festgestellt worden.⁴⁰

Im Gegenteil zu den SNPs sind Mutationen sehr selten auftretende Genvarianten, die eine Häufigkeit unter 1% in der Bevölkerung aufweisen. Die Fehler, die sie in der Proteinstruktur und in den Proteineigenschaften verursachen, reichen alleine aus, um eine vererbte Erkrankung auszulösen. Weitere äußere Faktoren spielen dabei eine untergeordnete Rolle.⁴¹

Abbildung 20 zeigt die möglichen Ergebnisse einer genetischen Analyse.⁴² Eine angemessene und präzise Interpretation dieser ist von enormer Wichtigkeit, um alle potentiellen Vorteile genetischer Studien zu nutzen.

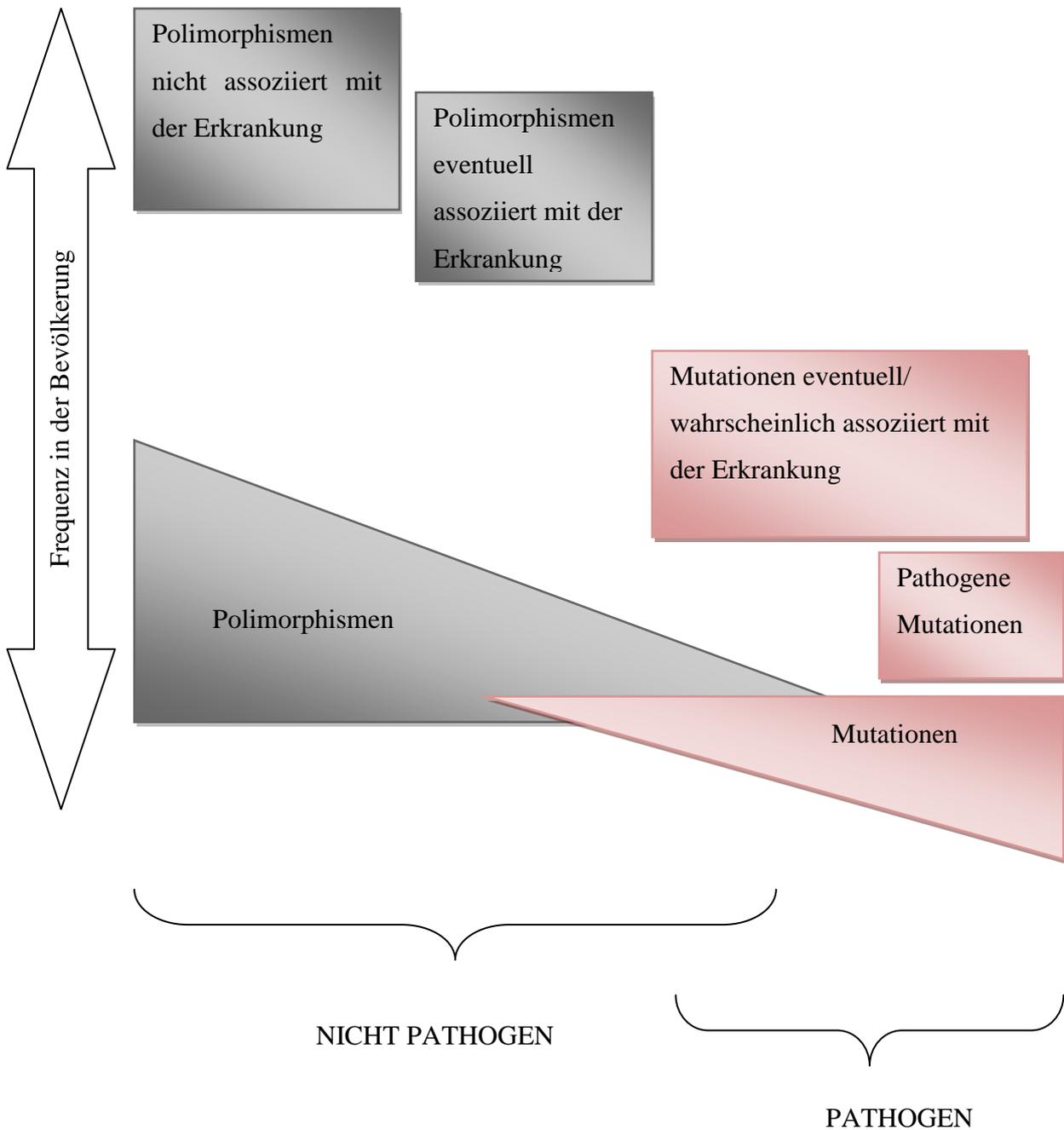


Abbildung 22: Schematische Darstellung der möglichen Ergebnisse einer genetischen Analyse. Die Frequenz in der Bevölkerung und die Pathogenität der festgestellten Varianten werden in Betracht gezogen.

5.4 Ergebnisse der genetischen Analyse von MURF 1, 2 und 3 und deren Bedeutung

In der Familie der MURFs wurden bisher keine bedeutenden Varianten, die mit Erkrankungen assoziiert sind, festgestellt. Es wurden keine Mutationen dieser Gene in der Literatur beschrieben. Deren Funktionen und bedeutender Rolle im Herzmuskelstoffwechsel legen die Vermutung nahe, dass sie mit fDCM in Verbindung stehen können. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die drei Gene in einer gut charakterisierten Kohorte von 92 Patienten mit fDCM auf Varianten hin überprüft. Es wurden eine Reihe von bekannten synonymen und nicht-synonymen SNPs gefunden, die lediglich einen geringeren Anteil aller in den Datenbanken bereits existierenden MURFs Varianten repräsentieren.

Da die synonymen Varianten keine Veränderung der Aminosäure verursachen und so die Proteinstruktur nicht ändern, sind sie als gutartig zu betrachten. Die 4 gefundenen nicht-synonymen SNPs führen dagegen zu einem Aminosäureaustausch und können somit negative Auswirkungen auf die Proteine haben. Die MAF für zwei von diesen ist vom 1000 Genome-Projekt validiert worden und beträgt bei Lys237Glu (rs2275950) 19,8% und bei Lys343Arg (rs7843605) 19,3%. Es handelt sich um sehr häufige SNPs, die in der Bevölkerung weit verbreitet auftreten. Die Übereinstimmung zwischen dem im fDCM Kollektiv ermittelten Wert (20,7 %) und der MAF beim ersten Fall und die deutlich geringere Verteilung in den 92 Proben (13%) bei dem zweiten schließen eine Krankheitsrelevanz für die fDCM aus.

Im Gegensatz dazu handelt es sich bei den zwei weiteren nicht-synonymen SNPs – Glu269Lys (rs61749355) und Glu140Lys (rs138811034) – um seltenere Varianten. Im fDCM Kollektiv sind sie mit einer Häufigkeit von jeweils 1,6% und von 0,5% zu finden. Bei beiden Varianten wird statt der sauren Glutaminsäure die basische Aminosäure Lysin in den Protein eingebaut. Dadurch wird eine Veränderung der Proteinstruktur verursacht, was zu Störungen der Proteinfunktion führen könnte. Diese Varianten sind jedoch bekannt und treten in der gesunden Bevölkerung als SNPs mit einer Allelfrequenz von 0,9% bzw. 0,3% auf. Es handelt sich folglich um sehr seltene Varianten. Die Vorhersage-Softwares SIFT und PolyPhen ordnen die voraussichtliche funktionelle Auswirkung beider SNPs auf das Protein als wahrscheinlich schädigend ein. Im Homologievergleich zeigt der betroffene Bereich sowohl in den ortologen als auch in den paralogenen Sequenzen eine hohe Konservierung. Die Aminosäureposition 269 in MURF 1 ist dabei sehr hoch konserviert (Tabelle 17 und 18).

Tabelle 17: Homologievergleich des betroffenen Bereichs in MURF 1. Die Aminosäureposition 269 ist rot markiert (Variante Glu269Lys)

	Aminosäuresequenz
Orthologe	
Homo sapiens (Mensch)	IQSLDE EP GGAT
Pan troglodytes (Schimpanse)	IQSLDE EP GGAT
Canis lupus (Hund)	IQSLDE EP GGAI
Bos taurus (Rind)	IQSLDE EP GGAI
Mus musculus (Maus)	IQSLDE EP GGAT
Rattus norvegicus (Wanderratte)	IQSLDE EP GGAT
Gallus gallus (Huhn)	IQAME ET GGAA
Macaca mulatta (Rhesusaffe)	IQSLDE EP GGAT
Paraloge	
MURF 2	IQFMDE EP EMAV
MURF 3	IQSM EE PQMAL

Tabelle 18: Homologievergleich des betroffenen Bereichs in MURF 2. Die Aminosäureposition 140 ist rot markiert (Variante Glu140Lys)

	Aminosäuresequenz
Orthologe	
Homo sapiens (Mensch)	YCLN CE VPTCS
Pan troglodytes (Schimpanse)	YCLN CE VPTCS
Canis lupus (Hund)	YCLN CE VPTCS
Bos taurus (Rind)	YCLN CE VPTCS
Mus musculus (Maus)	YCLN CE VPTCS
Rattus norvegicus (Wanderratte)	YCLN CE VPTCS
Gallus gallus (Huhn)	YCLN CE IPTCS
Danio rerio (Zebrafisch)	YCV TCS VPTCS
Paraloge	
MURF 1	YCL TCE VPTCS
MURF 3	YCL SCE VPTCS

Die hohen Konservierungsgrade und die Daten aus den Vorhersage-Softwares deuten darauf hin, dass bei Glu269Lys und Glu140Lys wahrscheinlich mit einer schädigenden Auswirkung auf der Funktion des Proteins zu rechnen ist. Der SNP Glu140Lys trat in einer Probe auf und war in keiner der untersuchten 358 Kontrollproben zu finden. Die Varianten zeigen in der fDCM-Gruppe die höchste Allelfrequenz und könnten einen genetischen Faktor bei der Entwicklung der DCM darstellen. Sie treten zwar häufiger als Mutationen auf, sind aber sehr selten vorkommende SNPs, die eine Zwischenstellung nehmen und genetische Suszeptibilitätsvarianten sein könnten. Beide SNPs stellen Varianten unklarer Signifikanz dar. Als komplexe heterogene Krankheit mit genetischem Hintergrund ist die fDCM mit mehreren

hereditären genetischen und umweltbezogenen Faktoren verbunden. Ein Polymorphismus ist sicher nicht ausreichend, um die DCM auszulösen, dieser könnte aber z.B. eine schwere oder leichte Verlaufsform mitbestimmen.⁴³ Im Gegenteil dazu ist eine Mutation allein krankheitsverursachend. In Abhängigkeit von deren Genlokalisierung, Homo- oder Heterozygotie, Aminosäureaustausch, Auswirkung auf Calciumsensitivität der Muskelzelle und auf Protein-Protein Interaktionen sowie anderen Faktoren bestimmt sie den klinischen Phänotyp.⁴¹ Auf Grund der Funktionen von MURF 1, 2 und 3 im Herzmuskel wird vermutet, dass Mutationen dieser Proteine eine dilatative Kardiomyopathie verursachen könnten. Die Ergebnisse der Untersuchung im Rahmen dieser Arbeit ergaben aber keine solchen Veränderungen der drei Gene. Folglich weisen die MURFs entweder keine fDCM-Mutationen auf, oder es handelt sich um sehr seltene Mutationen, die per Zufall im Kollektiv nicht zu finden waren. Obwohl die untersuchte Kohorte gut charakterisiert war, ist die Tatsache, dass keine potentielle Mutation gefunden wurde, mit Zurückhaltung zu interpretieren. Ein sicherer Ausschluss von einem Kandidaten gerade bei solch einer Erkrankung wie die fDCM, die sich mit sehr großer genetischer Heterogenität auszeichnet, ist sehr schwer möglich. Im Unterschied zu anderen genetischen Erkrankungen wie die zystische Fibrose, bei der die Mutation $\Delta F508$ für ca. 80% der Fälle verantwortlich ist, sind selbst die häufigen fDCM-Krankheitsgene wie LMNA, kodierend für das Protein Lamin A/C, relativ selten die Ursache der Erkrankung.⁸ Anhand einer Studie von Parks et al. weisen 5,9% der Proben in einer Kohorte von 324 nicht verwandten Patienten mit IDC/fDCM Mutationen in diesem Gen auf.⁴⁴ Zu den relativ häufigen fDCM-Krankheitsgenen zählen ebenso die β -Myosin-Schwerkette oder das kardiale Troponin I. Dagegen kommt ein Großteil der bekannten Mutationen sehr selten vor, so dass man sie auch als „privat“ bezeichnen kann, d.h. sie wurden oft nur innerhalb einer Familie gefunden.^{8, 14} Ein Beispiel dafür ist das Sarkomerprotein α -Actinin-2. Die Mutation Gln9Arg wurde bisher nur bei einer siebenjährigen Patientin identifiziert, die an DCM verstorben ist.⁴⁵

Solche Beispiele deuten auf die Komplexität der Analyse von Kandidatengenen für fDCM hin. Obwohl in der vorliegenden Arbeit keine Mutationen in der Gen-Familie der MURFs identifiziert worden sind, ist es durchaus möglich, dass sich in diesen Genen eine äußerst seltene Mutation verbirgt, die in der untersuchten Kohorte von 92 fDCM-Patienten jedoch nicht vorkommt.

5.5 Ausblick

MURF 1, 2 und 3 sind strukturell sehr ähnliche Proteine mit wichtigen Funktionen bei Aufbau, Stabilität und Energiestoffwechsel der Herzmuskelzelle. Störungen der MURFs könnten folglich zu Beeinträchtigungen dieser Funktionen führen. Es liegt in der bisher erschienenen Literatur jedoch keine Information zu bedeutenden genetischen Varianten vor, auch Mutationen wurden nicht beschrieben.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden bei der genetischen Analyse der drei Proteine neun bekannte SNPs gefunden. Vier von diesen waren nicht-synonym, d.h. sie bewirken einen Aminosäureaustausch und damit eventuell auch eine Veränderung der Proteinstruktur. Letzteres könnte meist in Kombination mit anderen genetischen Faktoren einen negativen Einfluss auf den Krankheitsverlauf nehmen. Auf Grund der existierenden Daten zu den Allelfrequenzen in der Bevölkerung ist für zwei von denen eine Relevanz für die fDCM unwahrscheinlich. Ein besonderes Augenmerk sollte auf die zwei weiteren sehr selten vorkommenden SNPs – Glu269Lys in Exon 5 von MURF 1 und Glu140Lys in Exon 3 von MURF 2 – gelegt werden. Sie stellen Varianten unklarer Signifikanz dar. Es sind weitere Untersuchung der Zusammenhänge zwischen den Polymorphismen und dem Krankheitsverlauf zu empfehlen. Wichtig ist die Analyse größerer Patienten- und Kontrollgruppen, was weiterer Aufschluss über die Häufigkeit und Verteilung der SNPs geben würde.

Es wurde zwar bei der vorgenommenen Analyse keine neuen genetischen Varianten gefunden, was jedoch keinen sicheren Ausschluss der MURFs als fDCM-Krankheitsgene bedeutet. Es ist durchaus möglich, dass es sich bei der MURF-Familie um sehr selten auftretende private Mutationen handelt, worüber weitere Untersuchungen von größeren Patientenkollektiven Aufschluss geben könnten. Weiterführende Experimente mit knock-out Tiermodellen würden zum besseren Verständnis der Bedeutung von MURFs im Hinblick auf fDCM beitragen. Genetische Analysen im Intronbereich der Gene sind ebenfalls sinnvoll.⁴²

In dieser Arbeit wurde ein Verfahren zur genetischen Analyse von MURF 1, 2 und 3 etabliert, das auch zur Untersuchung der Gene bezüglich ihrer Assoziation mit anderen Krankheiten, z.B. mit der hypertrophen Kardiomyopathie, verwendet werden kann.

6 Zusammenfassung

Die dilatative Kardiomyopathie ist eine primäre Herzmuskelerkrankung, die mit einer zunehmenden linksventrikulären Erweiterung und einer abnehmenden systolischen Funktion einhergeht. In 20% bis zu 50% der Fälle wird eine familiäre Häufung beobachtet, die sich durch extreme genetische Heterogenität auszeichnet. Es sind bis heute mehr als 30 Gene bekannt, die etwa ein Drittel der fDCM-Fälle aufklären konnten.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden MURF 1, 2 und 3 als interessante neue Kandidatengene für fDCM analysiert. Auf Grund ihrer wichtigen Rolle in der Herzmuskelzelle und ihrer vielfältigen Funktionen lässt sich eine Assoziation mit DCM vermuten. Die drei Gene wurden in einem gut charakterisierten Kollektiv von 92 fDCM Patienten untersucht. Mittels PCR und direkter Sequenzierung – etablierte sensitive Methoden – war eine erfolgreiche Überprüfung aller Exons auf Varianten hin möglich. Zur Kontrollgruppe gehörten 358 Proben von herzgesunden Patienten.

Es wurden insgesamt 5 synonyme und 4 nicht-synonyme SNPs gefunden, die alle bereits bekannt und in den entsprechenden Datenbanken beschrieben sind. Da in der Literatur eine schädigende Auswirkung von selten vorkommenden nicht-synonymen Polymorphismen auf den Organismus vermutet wird, stellen sich die Varianten unklarer Signifikanz – Glu269Lys in Exon 5 von MURF 1 und Glu140Lys in Exon 3 von MURF 2 – als interessant dar. Die Frage, ob diese SNPs eventuell mit dem Krankheitsverlauf einer fDCM assoziiert sein könnten, ist nur durch Familienuntersuchungen und Assays zur Funktion der Varianten zu beantworten.

Die hier durchgeführte genetische Analyse hatte zum Hauptziel, neue potentielle Mutationen zu identifizieren. Sie ergab jedoch keine unbekannte Variante. Dies kann vor allem im Hinblick auf die Erkrankung fDCM nicht eindeutig interpretiert werden: viele der für die DCM ursächlichen Mutationen haben eine sehr geringe Häufigkeit und konnten zum Teil nur innerhalb einer Familie gefunden werden. Da es sich bei den MURFs ebenso um sehr seltene private Mutationen handeln könnte, sind sie nicht sicher als Krankheitsgene auszuschließen. Eine Untersuchung in mehreren und größeren Patientenkollektiven kann zur weiteren Klärung beitragen. Generell sind die Analyse und die Aufklärung weiterer fDCM-Krankheitsgene wünschenswert und notwendig. Nur so kann man diese ernsthafte Erkrankung mit hoher Prävalenz und häufig letalem Verlauf besser verstehen und somit auch neue Strategien zur Früherkennung und Therapie entwickeln.

Literaturverzeichnis

- ¹ Jefferies J, Towbin J. *Dilated cardiomyopathy*. Lancet 2010; 375: 752-62.
- ² Kreuder J. *Kardiomyopathien. Klinische und pathogenetisch-pathophysiologische Grundlagen*. Monatsschrift Kinderheilkunde 2004; 152:620-631.
- ³ Richardson P, McKenna W, Bristow M, et al. *Report of the 1995 World Health Organization/International Society and Federation of Cardiology Task Force on the definition and classification of cardiomyopathies*. Circulation 1996; 93:841-842.
- ⁴ Maron BJ, Towbin JA, Thiene G, et al. *Contemporary definitions and classification of the cardiomyopathie*. Circulation 2006; 113:1807-1816.
- ⁵ Pankuweit S, Richter A, Ruppert V, et al. *Klassifikation, genetische Prädisposition und Risikofaktoren für die Entwicklung einer Kardiomyopathie*. Internist 2008; 49:441-447.
- ⁶ Elliot P, Andersson B, Arbustini E, et al. *Classification of the cardiomyopathies: a position statement from the European society of cardiology working group on myocardial and pericardial diseases*. Eur Heart J 2008; 29:207-276.
- ⁷ Mestroni L, Maisch B, McKenna W, et al. *Guidelines for the study of familial dilated cardiomyopathies*. Eur Heart J 1999; 20:93-102.
- ⁸ Hershberger RE, Morales A, Siegfried JD. *Clinical and genetic issues in dilated cardiomyopathy: A review for genetics professionals*. Genet Med 2010; 12(11):655-667.
- ⁹ Kasper E, Agema W, Hutchins G, Deckers J, Hare J, Baughman K. *The causes of dilated cardiomyopathy: a clinicopathologic review of 673 consecutive patients*. J Am Coll Cardiol 1994; 23: 586-590.
- ¹⁰ Burkett EI, Hershberger RE. *Clinical and genetic issues in familial dilated cardiomyopathy*. J Am Coll Cardiol 2005; 45:969-981.
- ¹¹ Dec GM, Fuster F. *Idiopathic dilated cardiomyopathie*. N Engl J Med 1994;331:1564-1575.
- ¹² Komajda M, Jais JP, Reeves F, et al. *Factors predicting mortality in idiopathic dilated cardiomyopathy*. Eur Heart J 1990; 11:824-831.
- ¹³ Hershberger RE, Cowan J, Morales A, et al. *Progress with genetic cardiomyopathies*. Circ Heart Fail 2009; 2:253-261.

-
- ¹⁴ Taylor MR, Carniel E, Mestroni L. *Cardiomyopathy, familial dilated*. Orphanet J Rare Dis 2006; 1:27.
- ¹⁵ Perrot A, Dietz R, Osterziel KJ. *Is there a common genetic basis for all familial cardiomyopathies?* Eur J Heart Failure 2007; 9:4-6.
- ¹⁶ Frey, N, Katus, HA. *Die dilatative Kardiomyopathie als genetische Erkrankung*. Der Internist 2007; 1:43-45.
- ¹⁷ Hershberger RE, Norton N, Morales A, et al. *Coding sequence rare variants identified in MZBPC3, MZH6, TPM1, TNNC1 and TNNI3 from 312 patients with familial or idiopathic dilated cardiomyopathie*. Circ Cardiovasc Genet 2010; 3:155-161.
- ¹⁸ Osterziel KJ, Haßfeld S, Geier C, Perrot A. *Familiäre dilatative Kardiomyopathie*. Herz 2005; 30:529-534.
- ¹⁹ Centner T, Yano J, Kimura E, et al. *Identification of muscle specific ring finger proteins as potential regulators of the titin kinase domain*. J Mol Biol 2001; 306:717-726.
- ²⁰ Gregorio CC, Perry CN, McElhinny AS. *Functional properties of the titin/ connectin associated proteins, the muscle-specific RING finger proteins (MURFs), in striated muscle*. J Muscle Res Cell Motil 2005; 26:389-400.
- ²¹ Dai KS, Liew CC. *A novel human striated muscle RING zinc finger protein, SMRZ, interacts with SMT3b via its RING domain*. J Biol Chem 2001; 276:23992-23999.
- ²² Kedar V, McDonough H, Arya R, et al. *Muscle-specific RING finger 1 is a bona fide ubiquitin ligase that degrades cardiac troponin I*. Proc Natl Acad Sci 2004; 101:18135-18140.
- ²³ Fielitz J, Kim MS, Shelton JM, et al. *Myosin accumulation and striated muscle myopathy result from the loss of muscle RING finger 1 and 3*. J Clin Invest 2007; 117:2486-2495.
- ²⁴ Willis MS, Schisler JC, Li L, et al. *Cardiac muscle ring finger-1 increases susceptibility to heart failure in vivo*. Circ Res 2009; 105: 80-88.
- ²⁵ Bodine SC, Latres E, Baumhueter S, et al. *Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy*. Science 2001; 294:1704-1708.
- ²⁶ McElhinny AS, Perry CN, Witt CC, Labeit S, Gregorio CC. *Muscle-specific RING finger-2 (MURF- 2) is important for microtubule, intermediate filament and sarcomeric M-line maintenance in striated muscle development*. J Cell Sci 2001; 117:3175-3188.

-
- ²⁷ Willis MS, Rojas M, Li L, et al. *Muscle ring finger 1 mediates cardiac atrophy in vivo*. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2009; 296:H997-H1006.
- ²⁸ Willis MS, Ike C, Li L, et al. *Muscle ring finger 1, but not muscle ring finger 2, regulates cardiac hypertrophy in vivo*. Circ Res 2007; 100:456-459.
- ²⁹ Witt SH, Granzier H, Witt CC, et al. *MURF-1 and MURF-2 target a specific subset of myofibrillar proteins redundantly: towards understanding MURF-dependent muscle ubiquitination*. J Mol Biol 2005; 350:713-722.
- ³⁰ Witt CC, Witt SH, Lerche S, et al. *Cooperative control of striated muscle mass and metabolism by MURF 1 and MURF 2*. EMBO J 2008; 27:350-360.
- ³¹ Spencer JA, Eliayer S, Ilaria RL, et al. *Regulation of microtubule dynamics and myogenic differentiation by MURF, a striated muscle RING- finger protein*. J Cell Biol 2000; 150:771-784.
- ³² Fielitz J, van Rooij E., Spencer JA, et al. *Loss of muscle specific RING- finger 3 predisposes the heart to cardiac rupture after myocardial infarction*. Proc Natl Acad Sci 2007; 104:4377-4382.
- ³³ Passarge E. *Taschenatlas der Genetik*. Thieme Verlag, 2. Auflage 2004.
- ³⁴ Knippers R. *Molekulare Genetik*. Thieme Verlag, 9. Auflage 2006.
- ³⁵ Dunnen, JT, Antonarakis SE. *Nomenclatur for description of human sequence variations*. Hum Genet 2001; 109:121-124.
- ³⁶ Borden KLB. *RING Domains: Master builders of molecular Scaffolds?* J Mol Biol 2000; 295:1103-1112.
- ³⁷ Altshuler D, Gibbs R, Peltonen L, et al. *International HapMap 3 Consortium. Integrating common and rare genetic variation in diverse human populations*. Nature 2010; 467(7311):52-58.
- ³⁸ Goldstein DB, Cavalleri GL. *Genomics: understanding human diversity*. Nature 2005; 437(7063):1241-2.
- ³⁹ Hinds DA, Stuve LL, Nilsen GB, et al. *Whole-genome patterns of common DNA variation in three human populations*. Science 2005; 307(5712):1072-9.
- ⁴⁰ Sunyaev S, Ramensky V, Koch I, Lathe W, Kondrashov AS, Bork, P. *Prediction of deleterious human alleles*. Hum Mol Gen 2001; 10(6):591-597.

-
- ⁴¹ Xu Q, Dewey S, Nguyen S, Gomes AV. *Malignant and benign mutations in familial cardiomyopathies: Insights into mutations linked to complex cardiovascular phenotypes.* J Mol Cell Cardiol 2010; 48(5):899-909.
- ⁴² Monserrat L, Mazzanti A, Ortiz- Genga M, et al. *The interpretation of genetic tests in inherited cardiovascular diseases.* Cardiogenetics 2011; 1:e8:30-36.
- ⁴³ Andersson B, Sylven C. *The DD genotyp of the angiotensin-converting enzyme gene is associated with increased mortalität in idiopathic heart failure.* J Am Coll Cardiol 1996; 28:162-167.
- ⁴⁴ Parks SB, Kushner JD, Nauman D, et al. *Lamin A/C mutation analysis in a cohort of 324 unrelated patients with idiopathic or familial dilated cardiomyopathy.* Am Heart J 2008; 156:161-169.
- ⁴⁵ Mohapatra B, Jimenez S, Lin JH, et al. *Mutations in the muscle LIM protein and alpha-actinin-2 genes in dilated cardiomyopathy and endocardial fibroelastosis.* Mol Genet Metab 2003; 80:207–15.

Internetquellen

- A. <http://user.meduni-graz.at/helmut.hinghofer-szalkay/VI.6.htm>
- B. http://www.charite-buch.de/kgl/index.php?option=com_content&view=article&id=14&Itemid=18
- C. Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM), <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Omim/>
C1 *115200
C2 *606131
C3 *606469
C4 *606474
- D. <http://www.fsbio-hannover.de/oftheweek/186.htm>
- E. Ensembl Datenbank, <http://www.ensembl.org>
- F. dbSNP homepage, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>
- G. 1000 Genomes database, <http://www.1000genomes.org/page.php>

Anhang

Tabelle I: Übersicht der verwendeten Primer, der PCR-Bedingungen und der Länge des PCR-Produktes und des jeweiligen Exons von MURF 1

Exon	Forward-Primer 5'-3' (bp entfernt vom Exon)	Reverse-Primer 5'-3' (bp entfernt vom Exon)	Annealing- temperatur (°C)	Zyklus- zahl	PCR- Produkt- Länge (bp)	Exonlänge* (bp)
1	'GACAAAGGCAAGACCCCCAGG' (83 bp)	'GGGTTTCATCACAGGGAAGCCA' (45 bp)	61	36	309	159 (298)
2	'GGGGTGGTTCGGATAGGCAG' (100 bp)	'GATGAAGGAGGGGGAAGGAGC' (65 bp)	65	38	359	173
3	'TTTAGGGCAGCCAAACTGA' (192bp)	'TCCCTCCAGAGAGACTATTCCTGA' (102 bp)	62	36	487	169
4	'CAGAGAGGGGAGGGAGGAAGC' (101 bp)	'TTAGTCCCTCCCCTGCCATCC' (124 bp)	68	38	342	96
5	'TCTTCTTCTGTAGTGTGGGGATGT' (137 bp)	'TGGGGAAGCATAACTTGAACC' (53 bp)	65	38	445	234
6 + 7	'GGCTAGGGAATGGCACCAAAT' (113 bp)	'TGTATCTGCCTCCCCATCGG' (73 bp)	67	38	654	23+ 125
8	'CCGTCTCTCTTGCCTGG' (84 bp)	'GCTGGGGACAGTTCTGAGCG' (102 bp)	62	38	278	72
9	'CGGGAGGAATTGGAGTTTGATGT' (125 bp)	'GCAGCGGTGAGGGTCCTACC' (159 bp)	67	38	315	11 (580)

* Es handelt sich um den Protein- kodierenden Teil des Exons, abzüglich der UTR-Bereiche; in Klammern ist die Länge des gesamten Exons angegeben.

Tabelle II: Übersicht der verwendeten Primer, der PCR-Bedingungen und der Länge des PCR-Produktes und des jeweiligen Exons von MURF 2

Exon	Forwärts-Primer 5'-3' (bp entfernt vom Exon)	Rückwärts-Primer 5'-3' (bp entfernt vom Exon)	Annealing- temperatur (°C)	Zyklus- zahl	PCR- Produkt- Länge (bp)	Exonlänge* (bp)
1	'AATGTCCTCCACCGAGAGAAACG' (128 bp)	'AGTGCTGGGACTACAGGCGTGAG' (122 bp)	63	33	439	168 (394)
2	'GGACCACTTGCTGAGAAAGCCCT' (152 bp)	'AAGCATTCAGCGTAGCAACCCAT' (65 bp)	70	35	413	173
3	'TGCCCCAGTGAGAGCTGATGG' (47 bp)	'CCCCAGGAAGGCCCTAAGGTGT' (44 bp)	68	38	279	166
4	'ATGACCAATTCACAGTCGGGG' (69 bp)	'GGAAGTCATAAACCCCCAGGC' (43 bp)	62	38	229	96
5	'TTCTTTCCCAGGATAACTAGGTGA' (82 bp)	'GCACATGGGGTTTATATTTTAGTTG' (106 bp)	62	38	448	234
6 + 7	'TGGCACCAAAGTAACAACCCAAAA' (325 bp)	'GCTTTCCTCCCACCAACTCTTC' (52 bp)	62	31	651	23+ 125
8	'GAGAAAACTCCCAGCCTTGAC' (110 bp)	'GACTTTTCTCCCCGACATGAGG' (146 bp)	70	38	531	251
9	'GCTTCTGGAGGGTGGGATGAA' (156 bp)	'GCCTGTTCCAGTGGGACCCTA' (42 bp)	67	35	507	288
10	'TGTGTGCGGAGGGGCTGTTT' (155 bp)	'TTGAGGCGATTGCATTGTGTGAG' (154 bp)	59	38	420	88
11	'GCCTGAACTCCTTTTTCCAAGA' (278 bp)	'AAGGAGAAGATATGGCGAGCTGG' (61 bp)	67	38	373	11 (122)

* Es handelt sich um den Protein- kodierenden Teil des Exons, abzüglich der UTR-Bereiche; in Klammern ist die Länge des gesamten Exons angegeben.

Tabelle III: Übersicht der verwendeten Primer, der PCR Bedingungen und der Länge des PCR Produktes und des jeweiligen Exons von MURF 3

Exon	Forwärts-Primer 5'-3' (bp entfernt vom Exon)	Rückwärts-Primer 5'-3' (bp entfernt vom Exon)	Annealing- temperatur (°C)	Zyklus- zahl	PCR- Produkt- Länge (bp)	Exonlänge* (bp)
1	'AGCCACAGAAGGGAATCCAGAGG' (102 bp)	'CACCACCCACCTCAGAGAGCACT' (95 bp)	62	38	388	168 (438)
2	'TAGCCCCAAGCCCTTCC' (85 bp)	'TGGCTCTGATGGGTTCCCTGG' (50 bp)	68	38	329	173
3	'TTGGTGGAGGCTGAAGAGAAGGT' (78 bp)	'ACCCTGTCCTAAGCCCCATCTC' (31 bp)	63	38	304	172
4	'GCCCCACTGCCACCATTAC ' (146 bp)	'GGGAGGCTGAGGTTGCTGTGA' (121 bp)	70	35	415	126
5	'TATGGGGGGTGAGGTGGAAGG' (112 bp)	'CCACTCCAGGACCCAGAAA' (107 bp)	68	38	336	96
6	'AGTACCCTGTGCTTTCCAGCC' (70 bp)	'GCAAGCAGGTGCAAGAGACAAGA' (77 bp)	68	38	404	234
7 + 8	'CGCAGGACTGTGGTGAGATTCA' (84 bp)	'GGTGGAGTCCCTGCCTTTACG' (73 bp)	67	38	436	23+125
9	'AAATGCTGCGGACCATCGACT' (148 bp)	'GAACAGCGGGTGAGGAGGAAA' (186 bp)	58	38	442	87
10	Nicht- kodierendes Exon					(533)

* Es handelt sich um den Protein- kodierenden Teil des Exons, abzüglich der UTR-Bereiche; in Klammern ist die Länge des gesamten Exons angegeben.

Tabelle IV: Referenzsequenzen für MURF 1

(Quelle: Ensembl Datenbank, Transcript ID: ENST00000374272)

Exon	Referenzsequenz
1	ATGGATTATAAGTCGAGCCTGATCCAGGATGGGAATCCCATGGAGAACTTGGAGAA GCAGCTGATCTGCCCTATCTGCCTGGAGATGTTTACCAAGCCAGTGGTCATCTTGCC GTGCCAGCACAACCTGTGCCGGAAGTGTGCCAATGACATCTTCCAG
2	GCTGCAAATCCCTACTGGACCAGCCGGGGCAGCTCAGTGTCCATGTCTGGAGGCCG TTTCCGCTGCCCCACCTGCCGCCACGAGGTGATCATGGATCGTCACGGAGTGTACGG CCTGCAGAGGAACCTGCTGGTGGAGAACATCATCGACATCTACAAACAGGAGTGCT CCAG
3	TCGGCCGCTGCAGAAGGGCAGTCACCCCATGTGCAAGGAGCACGAAGATGAGAAA ATCAACATCTACTGTCTCACGTGTGAGGTGCCACCTGCTCCATGTGCAAGGTGTTT GGGATCCACAAGGCCTGCGAGGTGGCCCCATTGCAGAGTGTCTTCCAGGGACAAAA G
4	ACTGAACTGAATAACTGTATCTCCATGCTGGTGGCGGGGAATGACCGTGTGCAGAC CATCATCACTCAGCTGGAGGATTCCCGTCGAGTGACCAAG
5	GAGAACAGTCACCAGGTAAAGGAAGAGCTGAGCCAGAAGTTTGACACGTTGTATGC CATCCTGGATGAGAAGAAAAGTGAGTTGCTGCAGCGGATCACGCAGGAGCAGGAG AAAAAGCTTAGCTTCATCGAGGCCCTCATCCAGCAGTACCAGGAGCAGCTGGACAA GTCCACAAAGCTGGTGGAAACTGCCATCCAGTCCCTGGACGAGCCTGGGGGAGCCA CCTTCCTCTTG
6	ACTGCCAAGCAACTCATCAAAG
7	CATTGTGGAAGCTTCCAAGGGCTGCCAGCTGGGGAAGACAGAGCAGGGCTTTGAGA ACATGGACTTCTTTACTTTGGATTTAGAGCACATAGCAGACGCCCTGAGAGCCATTG ACTTTGGGACAG
8	ATGAGGAAGAGGAAGAATTCATTGAAGAAGAAGATCAGGAAGAGGAAGAGTCCAC AGAAGGGAAGGAAGAAG
9	GACACCAGTAA

Tabelle V: Referenzsequenzen für MURF 2

(Quelle: Ensembl Datenbank, Transcript ID: ENST00000276573)

Exon	Referenzsequenz
1	ATGAGCGCATCTCTGAATTACAAATCTTTTTCCAAAGAGCAGCAGACCATGGATAA CTTAGAGAAGCAACTCATCTGTCCCATCTGCTTAGAGATGTTACGAAACCTGTGGT GATTCTCCCTTGTCAGCACAACTGTGTAGGAAATGTGCCAGTGATATTTTCCAG
2	GCCTCTAACCCGATTTTGCCACAAGAGGAGGTACCACCATGGCATCAGGGGGCCG ATTCCGCTGCCCATCCTGTAGACATGAAAGTGGTTTTGGATAGACATGGGGTATATGG ACTTCAGAGGAACCTGCTGGTGGAAAATATCATTGACATCTACAAGCAGGAGTCCA CCAG
3	GCCAGAAAAGAAATCCGACCAGCCCATGTGCGAGGAACATGAAGAGGAGCGCATC AACATCTACTGTCTGAACTGCGAAGTACCCACCTGCTCTCTGTGCAAGGTGTTTGGT GCACACAAAGACTGCCAGGTGGCTCCCCTCACTCATGTGTTCCAGAGACAGAAG
4	TCTGAGCTCAGTGATGGCATCGCCATCCTCGTGGGCAGCAACGATCGAGTCCAGGG AGTGATCAGCCAGCTGGAAGACACCTGCAAAACTATCGAG
5	GAATGTTGCAGAAAACAGAAACAAGAGCTTTGTGAGAAGTTTGATTACCTGTATGG CATTTTGGAGGAGAGGAAGAATGAAATGACCCAAGTCATTACCCGAACCCAAGAG GAGAACTGGAACATGTCCGTGCTCTGATCAAAAAGTATTCTGATCATTGGAGAA CGTCTCAAAGTTGGTTGAGTCAGGAATTCAGTTTATGGATGAGCCAGAAATGGCAG TGTTTCTGCAG
6	AATGCCAAAACCCTGCTAAAAAA
7	AATCTCGGAAGCATCAAAGGCATTTTCAGATGGAGAAAATAGAACATGGCTATGAGA ACATGAACCACTTCACAGTCAACCTCAATAGAGAAGAAAAGATAATACGTGAAATT GACTTTTACAGAG
8	AAGATGAAGATGAAGAAGAAGAAGAGGCGGAGAAGGAGAAAAAGAAGGAGAAG GAGAAGTGGGAGGAGAAGCAGTAGAAGTGGAAAGAGGTAGAAAATGTTCAAACAGA GTTTCCAGGAGAAGATGAAAACCCAGAAAAGCTTCAGAGCTCTCTCAGGTGGAGC TGCAGGCTGCCCCTGGGGCACTTCCAGTTTCTCTCCAGAGCCACCTCCAGCCCTGC CACCTGCTGCGGATGCCCTGTGACACAG
9	GGGGAGGTTGTACCCACTGGCTCTGAGCAGACCACAGAGTCTGAAACTCCAGTCCC TGCAGCAGCAGAACTGCGGATCCCTTGTTTTACCCTAGTTGGTATAAAGGCCAAA CCCGAAAGCCACCACCAACCCACCTTGCACCCCAGGGAGCGAAGGTCTGGGGCA AATAGGGCCTCCAGGTTCTGAGGATTCGAATGTACGGAAGGCAGAAGTGGCAGCAG CCGCAGCGAGTGAGAGGGCAGCTGTGAGTGTAAGGAACTAGTGCACCTGCAGCT ACTTCTCAG
10	GAGTTAGTAATCTGCCTAGCGCTTTTGGCTTTTCTTATTCTTCACTACATCTGGAGTC AGATTCAGTGCTTGATTTTACTTTAATGG
11	ATTGGATTTGA

Tabelle VI: Referenzsequenzen für MURF 3**(Quelle: Ensembl Datenbank, Transcript ID: ENST00000296098)**

Exon	Referenzsequenz
1	ATGAACTTCACAGTGGGTTTCAAGCCGCTGCTAGGGGATGCACACAGCATGGACAA CCTGGAGAAGCAGCTCATCTGCCCATCTGCCTGGAGATGTTCTCCAAACCAGTGGT GATCCTGCCCTGCCAACACAACCTGTGCCGCAAATGTGCCAACGACGTCTTCCAG
2	GCCTCGAATCCTCTATGGCAGTCCCGGGGCTCCACCACTGTGTCTTCAGGAGGCCGT TTCCGCTGCCCATCGTGCAGGCATGAGGTTGTCCTGGACAGACACGGTGTCTACGGC CTGCAGCGAAACCTGCTAGTGGAGAACATTATCGACATTTACAAGCAGGAGTCATC CAG
3	GCCGCTGCACTCCAAGGCTGAGCAGCACCTCATGTGCGAGGAGCATGAAGAAGAG AAGATCAATATTTACTGCCTGAGCTGTGAGGTGCCACCTGCTCTCTGCAAGGTC TTCGGTGCCCAAGGACTGTGAGGTGGCCCCACTGCCACCATTACAAACGCCA GAAG
4	AAACAGGATCTCACTCTGTTGCCAGGCTGGAGTGCAGTGGCACAAACACAACCTTA CTGCAGCCTTGATCTCCCGAGCTCAAGTGATCCTCCCATCTTAGCCTCGCAGAACAC TAAGATTATAGAT
5	AGTGAGCTCAGCGATGGCATCGCGATGCTGGTGGCAGGCAATGACCGCGTGCAAGC AGTGATCACACAGATGGAGGAGGTGTGCCAGACTATCGAG
6	GACAATAGCCGGAGGCAGAAGCAGTTGTAAACCAGAGGTTTGAGAGCCTGTGCGC AGTGCTGGAGGAGCGCAAGGGTGAGCTGCTGCAGGCGCTGGCCCGGGAGCAAGAG GAGAAGCTGCAGCGCGTCCGCGCCTCATCCGTCAGTATGGCGACCACCTGGAGGC CTCCTCTAAGCTGGTGGAGTCTGCCATCCAGTCCATGGAAGAGCCACAAATGGCGC TGTATCTCCAG
7	CAGGCCAAGGAGCTGATCAATAA
8	GGTCGGGGCCATGTCGAAGGTGGAGCTGGCAGGGCGGCCGGAGCCAGGCTATGAG AGCATGGAGCAATTCACCGTAAGGGTGGAGCACGTGGCCGAAATGCTGCGGACCAT CGACTTCCAGCCAG
9	GCGCTTCCGGGGAGGAAGAGGAGGTGGCCCCAGACGGAGAGGAGGGCAGCGCGGG GCCGGAGGAAGAGCGGCCGGATGGGCCTTAA

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater, Herrn PD. Dr. med. Cemil Özcelik, sowie meinem Betreuer, Herrn Dipl.-Ing. Andreas Perrot, für die hervorragende Betreuung.

Ein weiterer Dank geht an meinen Kommilitonen Frau Setareh Saleh-Edes und Herrn Klaus Donadt, von denen ich über diese Studie erfahren habe; an meinen Mitdoktoranden/-innen, sowie an allen Mitarbeitern/-innen des KardioGenetischen Labors für die nette Zusammenarbeit und die angenehme Arbeitsatmosphäre.

Meinen Mitbewohnerinnen und meinen Freunden danke ich für den Beistand und die Hilfsbereitschaft sowohl während der Arbeit an meiner Dissertation als auch während des gesamten Studiums.

Nicht zuletzt möchte ich meinen Eltern und insbesondere meiner Schwester für die Ermöglichung meines Studiums, für die ständige Unterstützung in jeglicher Hinsicht und den großen Glauben an mich von ganzem Herzen danken. Ohne sie wäre mein bisheriger Werdegang nicht möglich gewesen.

Lebenslauf

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

Eidesstattliche Erklärung

Ich, Zvetelina Vassileva, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Genetische Analyse der Muscle-specific RING finger Proteine 1, 2 und 3 bei Patienten mit familiärer dilatativer 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.

Berlin, den 1.10.2012

Zvetelina Vassileva