

Aus der Abteilung für Innere Medizin und Kardiologie des Deutschen Herzzentrums Berlin  
und der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Kardiologie der Medizinischen Fakultät  
Charite-Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Mutationsanalyse im MYBP-C-Gen  
bei Patienten mit hypertropher  
Kardiomyopathie**

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité - Universitätsmedizin Berlin

von  
Jaleh Maki Abadi  
Aus Teheran / Iran

**Gutachter:**

1. Prof. Dr. Med. V. Regitz-Zagrosek
2. Prof. Dr. Med. Chr. Hengstenberg
3. Prof. Dr. Med. V. Stangl

Datum der letzten Prüfung: 09.10.2008

Diese Arbeit widme ich meinen Eltern und meiner Schwester  
Frau Dr. Behjat Maki Abadi  
für ihren Einsatz gegen die Armut

# Inhaltsverzeichnis

<b>1.</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Hypertrophe Kardiomyopathie (HCM)</b>	<b>1</b>
1.1.1	Klinik und prognosebestimmende Faktoren	1
1.1.2	Diagnostik	2
1.1.3	Therapie	3
<b>1.2</b>	<b>Rolle und Struktur des MYBP-C</b>	<b>4</b>
<b>1.3</b>	<b>Regionen des kardialen MYBP-C</b>	<b>7</b>
1.3.1	N-terminale Region (Motive C0–C2)	7
1.3.2	Phosphorylierung des MYBP-C	7
1.3.3	Zentrale Region (Motive C3-C6)	8
1.3.4	C-terminale Region (Motive C7-C10)	8
<b>1.4</b>	<b>Zielstellung dieser Arbeit</b>	<b>8</b>
<b>2</b>	<b>Methoden</b>	<b>11</b>
<b>2.1</b>	<b>Methodischer Überblick</b>	<b>11</b>
<b>2.2</b>	<b>Isolierung und Aufarbeitung menschlicher DNA</b>	<b>12</b>
<b>2.3</b>	<b>Polymerasenkettenreaktion (PCR – Polymerase Chain Reaction)</b>	<b>13</b>
2.3.1	Reverse Transkription (RT-PCR)	15
2.3.2	Durchführung der RT-PCR:	16
2.3.3	Agarose-Gelelektrophorese der PCR-Produkte	16
<b>2.4</b>	<b>Single-Strand Conformational Polymorphism (SSCP)-Analyse</b>	<b>18</b>
2.4.1	Durchführung der SSCP-Analyse	19
2.4.2	SYBR®-Gold-Färbung	20
2.4.3	Durchführung der Färbung	21
<b>2.5</b>	<b>Sequenzierung</b>	<b>21</b>
2.5.1	Aufreinigung des PCR-Produktes	23
2.5.2	Durchführung der Sequenzierungs-PCR	23

2.5.3	Elektrophorese der Sequenzierungsproben	24
<b>2.6</b>	<b>Restriktionsfragmentlängen-Polymorphismus (RFLP)-Analyse</b>	<b>27</b>
2.6.1	Durchführung der RFLP-Analyse	27
<b>2.7</b>	<b>Haplotypanalyse</b>	<b>28</b>
<b>2.8</b>	<b>Statistik</b>	<b>28</b>
2.8.1	Allelhäufigkeit	29
2.8.2	Hardy-Weinberg-Gleichgewicht	29
2.8.3	Chi <sup>2</sup> - Test	30
<b>2.9</b>	<b>Materialien</b>	<b>32</b>
2.9.1	Geräte	32
2.9.2	Chemikalien	33
2.9.3	Sonstiges	33
2.9.4	Synthetische Oligonukleotide (Primer)	34
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>36</b>
<b>3.1</b>	<b>Aminosäuresubstitutionen</b>	<b>38</b>
3.1.1	Glu258Lys (E258K)	38
3.1.2	Arg282Trp (R282W)	40
3.1.3	Gly507Arg (G507R)	44
3.1.4	Gly523Trp (G523W)	46
3.1.5	Cys566Arg (C566R)	47
<b>3.2</b>	<b>Spleißmutationen</b>	<b>50</b>
3.2.1	IVS7 +1G/A	50
3.2.2	IVS7+1G>A ist eine Founder-Mutation	56
3.2.3	IVS20–2A/G	57
<b>3.3</b>	<b>Deletionen</b>	<b>60</b>
3.3.1	DelC343	60
3.3.2	DelC390	64

<b>3.4</b>	<b>Zwei Varianten mit unbekannter Krankheitsrelevanz</b>	<b>66</b>
3.4.1	IVS9-36G>A	66
3.4.1.1	Nachweis der funktionellen Relevanz von IVS9-36G>A	68
3.4.2	IVS17+11C>G	69
<b>3.5</b>	<b>Polymorphismen</b>	<b>71</b>
3.5.1	S236G	72
3.5.2	T262T	75
3.5.3	R326Q	77
3.5.4	IVS12-24C/T	79
3.5.5	IVS13+29G/A	82
3.5.6	IVS19+47G/A	83
3.5.7	IVS21+38A/T	85
3.5.8	Gemeinsames Auftreten der Varianten R326Q und IVS21+38A/T	86
<b>4</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>87</b>
<b>4.1</b>	<b>Der Krankheitsmechanismus von Mutationen im MYPB-C</b>	<b>87</b>
4.1.1	Haploinsuffizienz	89
4.1.2	Dominant-negative Wirkung (“poison polypeptide”)	89
4.1.3	Kotranslation	90
4.1.4	Funktionseinbußen des MYBP-C ohne “Gift”-Wirkung	90
4.1.5	Störung der Phosphorylierung	90
4.1.6	Polymorphismen	91
<b>4.2</b>	<b>Die Missense-Mutationen</b>	<b>91</b>
4.2.1	E258K	92
4.2.2	R282W	93
4.2.3	G507R	93
4.2.4	G523W	94
4.2.5	C566R	94
<b>4.3</b>	<b>Spleißmutationen und Deletionen</b>	<b>95</b>
<b>4.4</b>	<b>Varianten mit unbekannter Pathogenität</b>	<b>95</b>
<b>4.5</b>	<b>Polymorphismen</b>	<b>96</b>

4.5.1	S236G	96
4.5.2	R326Q	96
4.5.3	Häufige Varianten	97
4.5.4	Seltene Varianten	97
4.5.5	Mutationen in demselben Gen verursachen HCM und DCM	98
<b>4.6</b>	<b>Schlussfolgerung</b>	<b>98</b>
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>99</b>
<b>6</b>	<b>SUMMARY</b>	<b>102</b>
<b>7</b>	<b>ABKÜRZUNGEN</b>	<b>104</b>
<b>8</b>	<b>DANKSAGUNG</b>	<b>108</b>
<b>9</b>	<b>ANHANG</b>	<b>109</b>
<b>9.1</b>	<b>Erklärung</b>	<b>109</b>
<b>9.2</b>	<b>Tabellarischer Überblick über die Genotypen</b>	<b>110</b>
<b>9.3</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>114</b>

## **1. Einleitung**

### **1.1 Hypertrophe Kardiomyopathie (HCM)**

Kennzeichen der hypertrophen Kardiomyopathie (HCM) ist eine deutliche, regional begrenzte und oft asymmetrische Zunahme der linksventrikulären Muskelmasse ohne offensichtlichen Widerstand im Kreislauf (z.B. ein Klappenvitium). Bei stark asymmetrischer, septumbetonter Hypertrophie wird eine Obstruktion der linksventrikulären Ausflussbahn beobachtet, man unterscheidet also obstruktive (HOCM) und nicht obstruktive Formen. Histologisch ist ein Verlust der regelmäßigen Anordnung der Kardiomyozyten zu sehen (disarray). Damit einher geht der Verlust von Zell-Zell-Kontakten (gap junctions), die im Normalfall die elektrische Erregung im Herzen weiterleiten. Durch den Verlust an geordneten Strukturen kommt es zur Störung der Erregungsausbreitung im Ventrikelmyokard (Vosberg et al., 1998). Bei der HCM handelt es sich um ein klinisch variables und genetisch heterogenes Krankheitsbild, bei betroffenen Personen konnte eine Vielzahl von unterschiedlichen Mutationen gefunden werden (s. Tab. 1). Als viertes Gen, bei dem Mutationen zur Erkrankung führen, wurde das Myosinbindungsprotein C3 identifiziert (Carrier et al., 1993).

Die Prävalenz der HCM liegt bei ca. 0,2% der Bevölkerung, somit handelt es sich um eine relativ häufige Erkrankung. Maligne Arrhythmien mit plötzlichem Herztod stellen beispielsweise die häufigste Todesursache bei jungen Athleten dar (Maron et al., 1996; Maron et al., 1995; Miura et al., 2002). Die jährliche Mortalität in der Gesamtbevölkerung beträgt ca. 1%. Für symptomatische Patienten liegt sie bei 3-6%, und für reanimierte Patienten (mit sog. überlebtem plötzlichem Herztod) bei ca. 17%. Bei Kindern finden sich doppelt so hohe Mortalitäten. Entsprechend der Pathophysiologie treten 50-80% der Todesfälle plötzlich auf. Betroffen sind häufig gering symptomatische jüngere Patienten (45±20 Jahre) (Maron et al., 2002).

#### **1.1.1 Klinik und prognosebestimmende Faktoren**

Klinisch äußert sich die HCM vor allem durch diastolische Dysfunktion und Verminderung der Ejektionsfraktion des linken Ventrikels mit Belastungsdyspnoe, Orthopnoe, Angina und Müdigkeit, aber auch durch Palpitationen, Synkopen und Arrhythmien (Maron et al., 1997).

Liegt eine Obstruktion des linksventrikulären Ausflusstraktes vor, ist das Risiko des spontanen Herztods und der Zunahme der Herzinsuffizienz (bis zu den Stadien NYHA III und IV) deutlich erhöht (Maron et al., 2003). Die Ausprägung des Phänotyps nimmt mit dem Alter zu, Männer sind häufiger und stärker betroffen als Frauen. Viele Patienten mit linksventrikulärer Hypertrophie zeigen keine oder nur eine geringe Beeinträchtigung der kardialen Funktion und haben eine normale Lebenserwartung.

Prognosebestimmend sind: 1) überlebter Herzstillstand, 2) Kammerflimmern/anhaltende ventrikuläre Tachykardien (VT), 3) familiäre Häufung plötzlicher Todesfälle, 4) extreme linksventrikuläre Hypertrophie (Septumdicke  $\geq 30$  mm), 5) Synkopen, 6) multiple nicht anhaltende ventrikuläre Tachykardien im Langzeit-EKG, 7) unzureichender Blutdruckanstieg unter Belastung und 8) der Nachweis eines hohen Fibroseanteils in einer Biopsie (Maron et al., 2002).

### **1.1.2 Diagnostik**

EKG-Veränderungen lassen sich in ca. 95% der Fälle nachweisen, sind jedoch für die Erkrankung unspezifisch. Eine Röntgenuntersuchung des Thorax ist in frühen Stadien unauffällig. Den diagnostischen Goldstandard für die Diagnose einer HCM stellt die Echokardiographie dar. In der 2-D-Untersuchung stellt sich ein asymmetrisch hypertrophierter linker Ventrikel mit normaler bis hyperkontraktiler systolischer Pumpfunktion dar. Wenn vorhanden, kann ein Systolic anterior movement (SAM)-Phänomen im 2-D-Bild erkannt werden. Im M-Mode werden die Areale der maximalen Hypertrophie ( $>15$ mm) quantifiziert. Begleitende Klappeninsuffizienzen lassen sich in der Farbduplexuntersuchung darstellen. Mittels Gewebedoppler oder Continuous-Wave (CW)-Doppler über der Mitralklappe läßt sich eine diastolische Füllungsstörung aufdecken. Eine diastolische Funktionsstörung findet sich häufig bereits bei asymptomatischen Mutationsträgern. Bei der CW-Doppleruntersuchung des linksventrikulären Ausflußtraktes läßt sich eine eventuelle Obstruktion beurteilen zum Nachweis einer obstruktiven Komponente.

Patienten, die über belastungsabhängige Beschwerden klagen, aber im Echo keinerlei Gradienten aufweisen, sollten auf jeden Fall durch ein Stressecho untersucht werden, um eine latente HOCM mit einem belastungsabhängigen Gradienten im linksventrikulären Ausflußtrakt nicht zu übersehen. Eine Ergometrie zur Beurteilung der Blutdruckregulation



unter Belastung und der Leistungsfähigkeit sollte vor allem bei jüngeren HCM-Patienten durchgeführt werden. Die Magnetresonanztomographie des Herzens ist die Methode der Wahl, um das Ausmaß und den Schweregrad der linksventrikulären Hypertrophie bei schwer schallbaren Patienten und bei Patienten mit apikaler HCM zu diagnostizieren. Die invasive Diagnose mittels Herzkatheter bleibt speziellen Fragestellungen vorbehalten (Ackerman, 2005).

Die spezifischste Untersuchung zur Aufdeckung einer HCM ist die Gewebe-Doppler Untersuchung (Nagueh et al., 2003), da eine molekulargenetische Untersuchung wegen der Vielfalt an bekannten krankheitsverursachenden Mutationen (vgl. Tab. 1) unverhältnismäßig aufwändig ist und ihre Aussagekraft ist aufgrund der variablen Penetranz ohnehin stark eingeschränkt ist.

### **1.1.3 Therapie**

Als medikamentöse Basistherapie symptomatischer Patienten werden sowohl Kalziumantagonisten als auch  $\beta$ -Blocker eingesetzt. Bei begleitender Herzinsuffizienz wird auf die typische Herzinsuffizienztherapie zurückgegriffen (ACE-Hemmer, Diuretika). Bei häufigen Arrhythmien können auch zusätzliche Antiarrhythmika zum Einsatz kommen. Für gefährdete bzw. medikamentös therapierefraktäre Patienten stehen die operative Myektomie, die transkoronare Ablation einer Septumhypertrophie (TASH), AV-sequentielle Schrittmacherstimulation, AV-Knoten-Ablation bei Vorhofflimmern und bei anhaltenden ventrikulären Tachykardien die Implantation eines Kardioverter-Defibrillators (ICD) zur Verfügung (Gietzen et al., 2005). Als ultima ratio kommt eine Herztransplantation in Frage.

**Tab.1:** Proteine mit HCM-verursachenden Mutationen ( Marian und Roberts 2001, Richard et al, 2003, Scheffold et al., 2005 und Ackerman, 2005).

Protein	Gen-Symbol	Lokus	Häufigkeit %	Klinischer Test
β-Myosin-Schwerkette	MHY7	14q11.2	40	Ja
Myosinbindungsprotein C3	MYBP-C	11p11.2	40	Ja
Troponin T	TNNT2	1q32	5	Ja
Troponin I	TNNI3	19p13.4	1,8	Ja
Troponin C	TNNC1	3p21.1	< 0.01	Ja
α-Tropomyosin	TPM1	15q22.1	1,2	Ja
Regulatorische Myosin-Leichtkette	MYL2	12q23-q24.3	2	Ja
Essentielle Myosin-Leichtkette	MYL3	3p21.2-p21.3	0,1	Ja
Aktin	ACTC	15q14	0,2	Ja
Titin	TTN	2q24.3	?	Nein
α-Myosin-Schwerkette	MYH6	14q11.2- q12	?	Nein
Caveolin-3	CAV3	3p26.1	?	Nein
Muskel-LIM-Protein	MLP	11p15.1	?	Nein
Telethonin	TCAP	17q12q21. 1	?	Nein
AMP-aktivierende Proteinkinase	PRKAG2	7q36.1	?	Ja
Myosinleichtketten-Kinase 2	MYLCK	20q13.3	?	Nein
Lysosom-assoziiertes Membranprotein	LAMP 2	Xq24	?	Ja
Mitochondriale DNA	MTTI	?	?	Nein

## 1.2 Rolle und Struktur des MYBP-C

Mutationen im Myosinbindungsprotein C3 (MYBP-C)-Gen gehören mit 20% (einige Schätzungen gehen von bis zu 40% aus) zu den häufigsten genetischen Ursachen der hypertrophen Kardiomyopathie (Flavigny et al., 1999).

MYBP-C ist ein großes Multi-Domänen-Protein, das erstmals 1971 von Starr und Offer (Starr et al., 1971) als ein Kontaminant in Muskelpräparaten beschrieben wurde. Seine Rolle im Sarkomer ist bis heute noch nicht völlig aufgeklärt (Oakley et al., 2004). Nach dem jetzigen Stand der Wissenschaft hat es vermutlich mehrere Aufgaben: einige Proteinregionen

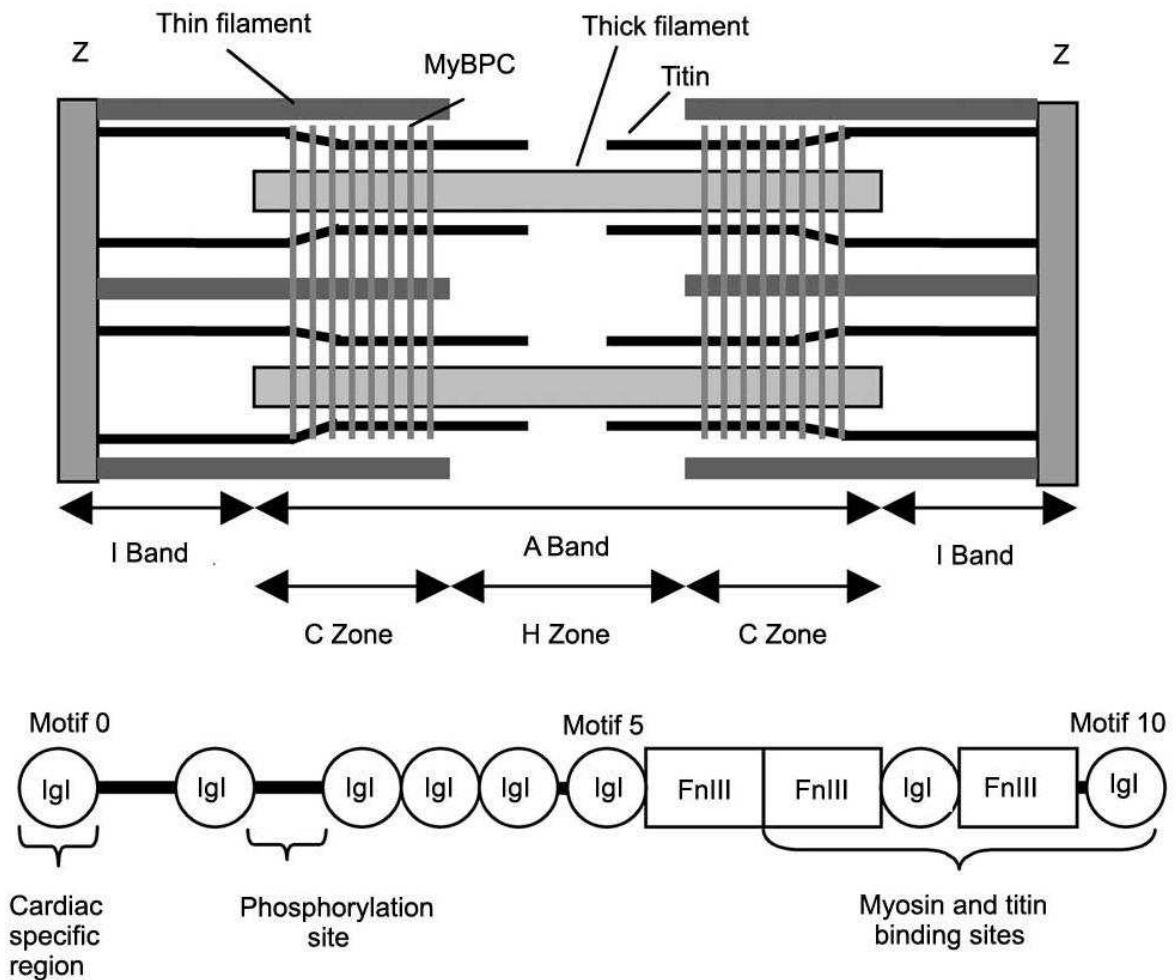
regulieren durch Beteiligung an der adrenergen Signalkette die Muskelkontraktion, und andere Proteinregionen interagieren mit verschiedenen Anteilen von Myosin und Aktin bzw. Titin. Über die C-terminalen Domänen, die an Titin und leichtes Meromyosin binden können, fördert MYBP-C wahrscheinlich die Polymerisierung der dicken Myosinfilamente (Gilbert et al., 1996). Auch zwischen den einzelnen Domänen des MYBP-C wurden Interaktionen gefunden. Der genaue Ort, an dem MYBP-C in das Myosinfilament eingebaut wird, ist noch unklar. MYBP-C lässt sich jedoch eindeutig in den dicken Myofibrillen der zentralen Region des A-Bandes, bekannt als C-Zone (Abb. 1) (Craig und Offer, 1976), nachweisen. Von den 11 transversen Streifen der C-Zone enthalten sieben bis neun Streifen MYBP-C (siehe Abb.1) (Bennett et al., 1986).

MYBP-C ist ein modulares Polypeptid von ungefähr 137 kDa, das der Superfamilie der intrazellulären Immunglobuline angehört. Von seiner Grundstruktur her besteht MYBP-C aus acht Immunglobulin-I (IgI)-Domänen und drei Fibronectin Typ III (FnIII)-Domänen, welche ihrerseits aus je 90 bis 100 Aminosäuren (Miyamoto et al., 1999) bestehen. Bei den IgI-Domänen handelt es sich um Immunglobulindomänen, die sowohl Merkmale der variablen als auch der konstanten Regionen von Immunglobulinen aufweisen (I = intermediate).

Von N-terminal nach C-terminal sind die Domänen als Motive 0 bis 10 wie folgt angeordnet(siehe Abb.1): Ig-Ig-Ig-Ig-Ig-Ig-**Fn-Fn-Ig-Fn-Ig**.

Es gibt drei Isoformen des MYBP-C: zwei skeletale Isoformen („fast“, das kodierende Gen liegt auf Chromosom 19 q13.33, und „slow“, deren kodierendes Gen auf Chromosom 12 q23.3 liegt) sowie eine kardiale Isoform, deren kodierendes Gen auf Chromosom 11p11.2 liegt. Das Gen, das für die kardiale Isoform kodiert, ist rund 24.000 Basenpaare (kbp) lang und enthält 35 Exone (Gautel et al., 1995). Daraus, dass sich für die drei Isoformen drei unterschiedliche Gene auf unterschiedlichen Chromosomen haben nachweisen lassen, kann geschlossen werden, dass es sich tatsächlich evolutionär um drei verschiedene Proteine handelt, und nicht um alternative Spleißprodukte eines einzelnen Gens. Die kardiale Isoform enthält im Gegensatz zu den Skelettmuskelformen am N-terminalen Ende noch eine zusätzliche IgI-Domäne (C0). Ferner enthält der evolutionär hochkonservierte LAGGGARRIS-Abschnitt, der als Verbindungsstück (linker) zwischen den Domänen C1 und C2 dient, in der kardialen Isoform drei Phosphorylierungsstellen anstelle einer in den Skelettmuskelformen. Der Grad der Phosphorylierung des MYBP-C ist entscheidend für

die Entwicklung der systolischen Wandspannung des Herzens und wird durch adrenerge Stimulation vermittelt (Winegrad et al., 1999). Außerdem enthält die Domäne C5 des kardialen MYBP-C einen Prolin-reichen Abschnitt (Hartzell und Glass, 1984), dessen genaue Funktion jedoch noch nicht aufgeklärt werden konnte (Gautel et al., 1995).



**Abb.1:** Die Position des MYBP-C in den gedehnten Sarcomeren und die Struktur des kardialen MYBP-C. Die obere schematische Darstellung der Sarcomere gibt den Standort des MYBP-C an. Das MYBP-C besteht aus transversen Streifen, die mit einem Abstand von 43 nm in der C-Zone liegen, wo eine Interaktion zwischen den dicken und dünnen Fäden stattfindet. Die untere Darstellung zeigt, dass sich das kardiale MYBP-C aus acht Igl Domänen und drei FnIII Domänen zusammensetzt. Das Motif 0 ist kardial spezifisch. Die Phosphorylationstellen liegen zwischen den Motiven 1 und 2. Die Motive 7-10 binden an das Myosin und Titin (Oakley et al. 2004).

## **1.3 Regionen des kardialen MYBP-C**

### **1.3.1 N-terminale Region (Motive C0–C2)**

Innerhalb der Motive C0–C2 des kardialen MYBP–C könnte es drei Bindungsstellen für Myosin geben. Es wird diskutiert, daß das Motiv C0 und der „Linker“ zwischen C0 und C1 an Myosin und/oder Aktin gebunden sein könnte (Witt et al., 2001). Die Funktion des herzspezifischen Motivs C0 ist bislang unklar (Oakley et al., 2004), es konnte jedoch gezeigt werden, daß C0 an Aktin bindet, wenn MYBP-C nicht phosphoryliert ist (Kulikovskaya et al., 2003). Diese Ergebnisse konnten in einem Homologie-Modell bestätigt werden, bei der das an Prolin und Alanin reiche Verbindungsstück zu C1 als ein möglicher Kandidat für die Aktin-Bindungsstelle identifiziert werden konnte (Squire et al., 2003). Die Motive C0 und C1 sind wahrscheinlich nicht in der Lage, an Myosinquerbrücken, Myosinschaft und Aktin gleichzeitig zu binden.

Das Verbindungsstück zwischen C1 und C2 enthält die hochkonservierte, herzspezifische LAGGRRIS- Sequenz, und wird daher als das MYBPC-Motiv bezeichnet. Es besteht aus 103 Aminosäuren. Dieser Linker hat aufgrund der drei Phosphorylierungsstellen eine besondere Bedeutung für die Herzisoform. Vermutlich wird die Muskelkontraktion durch Bindung des Linkers zwischen C1 und C2 an das Subfragment-2 (S2)-Region von Myosin reguliert (Gruen et al., 1999).

### **1.3.2 Phosphorylierung des MYBP-C**

Die kontraktile Eigenschaften des Herzmuskels sind abhängig vom Grad der Phosphorylierung des MYBP-C, über die die Kalziumsensitivität des Herzmuskels reguliert wird (McClellan et al., 2001). In funktionellen Studien konnte gezeigt werden, dass die Dephosphorylierung von MYBP-C die maximale Kraftentwicklung vermindert (Kunst et al., 2000). Innerhalb des Verbindungsstücks zwischen C1 und C2 konnten drei Phosphorylierungsstellen identifiziert werden. Interessanterweise konnten auch in vivo mono- und di-phosphorylierte Proteine nachgewiesen werden, was als Hinweis auf eine sehr subtile Regulation der Proteinfunktion dienen kann (Oakley et al., 2004).

### **1.3.3 Zentrale Region (Motive C3-C6)**

Die Funktion der Immunglobulinmotive C3 und C4 konnte noch nicht völlig aufgeklärt werden, sie scheinen jedoch für die Flexibilität des N-Terminus wichtig zu sein, wie sich in elektronenmikroskopischen Untersuchungen an isoliertem kardialen MYBP-C zeigen ließ (Harzell et al., 1985). Der Linker zwischen C4 und C5 besteht aus 10 Aminosäuren und ist hochflexibel (Moolman-Smook et al., 2002). Idowu et al. (2003) zeigten, dass dieser Linker eigentlich ein integraler Bestandteil der Falte von C5 ist. C5 selbst besitzt in der CD-Schleife eine mindestens 28 Aminosäuren lange, Prolin-reiche, herzspezifische Insertion, welche sehr in ihrer Sequenz und Länge variiert. Nach dem Modell von Moolmann-Smook et al. bindet C5 an C8 des benachbarten MYBP-C-Moleküls (Moolman-Smook et al., 2002), definitiv aufgeklärt werden konnte dies allerdings noch nicht (Oakley et al., 2004).

### **1.3.4 C-terminale Region (Motive C7-C10)**

Die Motive C7 bis C10 binden vermutlich die Myosinschaftregion (LMM) (Starr und Offer, 1978). Die hauptsächlichen Bindungsstellen für Myosin und Titin befinden sich in den Motiven C8-C10. (Freiburg et al., 1996). Diese drei C-terminalen Domänen werden für die Integration in das A-Band des Sarkomers (Gilbert et al., 1996) benötigt, das Motiv C7 trägt zur Verbesserung der Bindung des MYBP-C an die C-Zone bei (Gilbert et al., 1999).

## **1.4 Zielstellung dieser Arbeit**

Zu Beginn der vorliegenden Dissertation (1999 -2001), existierten mehrere Studien zur Genotyp-Phänotyp-Korrelation. Damals stellten diese Genotyp-Phänotypkorrelationen eine wichtige Fragestellung dar. Es wurden zahlreiche Mutationen und deren Krankheitsverlauf von Familienstudien berichtet. Man versuchte herauszufinden, ob bestimmte Genmutationen mit einem malignen Verlauf und oder höhere Wahrscheinlichkeit für plötzlichen Herztod wie bei einigen Mutationen in Troponin-T beschrieben, assoziiert sind. Weiterführende Genotyp-Phänotyp-Korrelationsstudien und die Analyse klinischer Daten in HCM-Familien waren wichtig und sollten HCM-Patienten mit hohem Risiko besser identifizieren. Die Korrelationen zwischen Genotyp und Phänotyp sollten teilweise prognostische Aussagen im Hinblick auf die Merkmalsausprägung und die Lebenserwartung erlauben (Keller et al., 2005).

Damals wurden mehr als 120 Mutationen in ca. 11 Genen gefunden, die alle sarkomerische Proteine kodieren und zu der familiären hypertrophen Kardiomyopathie führen. Damals war aber nicht bekannt, dass Hauptverursacher dieser Krankheit die Mutationen in MYH7 und MYBP-C- Gen sind (Vosberg, 2003). Die Vorherrschaft der HCM-verursachenden Mutationen in MYBP-C-Gen wurde unterschätzt (Jääskeläinen et al., 2002). Die Mutationen in MYBP-C waren als altersabhängige Penetranz mit spätem Beginn der Krankheit und benignem Krankheitsverlauf bekannt. Die Mutationen in MYBP-C wurden als Ursache für ca. 15% von HCM-Fällen eingeschätzt (Maron et al, 2001, Niimura et al, 1998).

Die bisherigen Studien veröffentlichten Angaben über Frequenz der Mutationen, die hauptsächlich auf Familienstudien basiert waren. Deshalb war damals die Häufigkeit der unterschiedlichen Genmutationen in einem Krankengut oder in den unterschiedlichen Populationen wenig bekannt. In unserer Studie wurde zum ersten Mal bei einer großen Zahl von nicht verwandten HCM-Patienten mit deutscher Abstammung ein systematisches Mutationsscreening durchgeführt. Deshalb haben wir die Krankheitspenetranz nicht beobachtet. Wir haben uns beschränkt, die charakteristischen Merkmale der Indexpatienten und verfügbare Familienmitglieder zu beschreiben.

In unserer Studie wurde die größte Zahl von Mutationen in MYBP-C (18.5%) gefunden mit einem breiten Spektrum von Mutationstypen. Das Alter zum Zeitpunkt der Diagnosestellung lag bei Patienten mit Mutationen, die Proteinabbruch verursachen  $34 \pm 11$ . Diese Gruppe zeigten die höchste Rate an Myoektomie, TASH, und ICD ( $p < 0.05$ ) (Erdmann et al, 2001,2003). Bei mehr als 60% der Patienten mit Mutationen ohne Proteinabbruch wurden invasive Prozedere durchgeführt.

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurde ein Mutations-Screening mittels PCR-SSCP-Analyse durchgeführt. Insgesamt wurden 106 Patienten mit HCM oder HOCM in Hinblick auf Mutationen im MYBP-C-Gen (Exon 6 bis 21) von 1999 bis 2001 untersucht. Diese Patienten wurden zum großen Teil im Deutschen Herzzentrum Berlin (DHZB) behandelt. Die Patienten wurden zum Ausschluss anderer Hypertrophieursachen nach international anerkannten Kriterien (Maron, McKenna et al. 2003), 24h-EKG, Echokardiographie und Angiographie diagnostiziert. Patienten, bei denen bereits eine Myektomie durchgeführt worden war, wurden unabhängig von echokardiographischen Kriterien in die Studie eingeschlossen.

Mit Hilfe der Single-Strand-Conformation-Polymorphism-Analyse (SSCP-Analyse) wurde in diesem großen Patientenkollektiv ein systematisches Mutationsscreening in MYBP-C angestrebt. Die gefundenen Varianten wurden durch DNA-Sequenzierung sowie Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismen-Analyse charakterisiert.

Ziel der vorliegenden Dissertation ist es in einem nicht verwandten, konsekutiven großen Patientenkollektiv mit hypertropher Kardiomyopathie die Häufigkeit und Art von Mutationen im MYBP-C-Gen zu bestimmen und die damit assoziierten klinischen Phänotypen zu beschreiben. Zusätzlich sollten die Familienmitglieder des gefundenen Mutationsträger nach dieser Mutation untersucht werden. Die gefundenen Varianten sollten mit den bereits in der Literatur beschriebenen Variaten verglichen werden.



## 2 Methoden

### 2.1 Methodischer Überblick

In die systematische Variantensuche mittels PCR, SSCP-, RFLP-Analyse und Sequenzierung wurden insgesamt 106 nichtverwandte Patienten, bei denen in den Jahren 1995-1999 die klinische Diagnose einer HCM oder HOCM gestellt wurde, einbezogen.

Das Patientenkollektiv bestand aus 106 nichtverwandten Patienten (68 männlichen und 38 weiblichen Personen) mit HCM/HOCM im Alter von 12-82 Jahren. Bis auf wenigen Ausnahmen wurden diese Patienten im Deutschen Herzzentrum Berlin (DHZB) behandelt. Das Durchschnittsalter betrug 53,2 Jahre. Das Alter zum Zeitpunkt der Diagnosestellung lag bei  $45,5 \pm 14$  Jahren. Neun von 106 Patienten sind türkischer, alle anderen Patienten deutscher Abstammung.

Die Patienten wurden zum Ausschluß anderer Hypertrophieursachen nach international anerkannten Kriterien (Maron, McKenna et al. 2003), 24h-EKG, Echokardiographie und Angiographie diagnostiziert. Patienten, bei denen bereits eine Myektomie durchgeführt worden war, wurden unabhängig von echokardiographischen Kriterien in die Studie eingeschlossen. Die Patienten wurden in regelmäßigen Abständen klinisch untersucht. Familienmitglieder der betroffenen Patienten wurden zur klinischen Untersuchung und zur Blutentnahme für genetische Analysen eingeladen.

Im Rahmen dieser Dissertation wurden die kodierenden Genregionen des MYBP-C-Gens (Exon 6 bis Exon 21) in unserem Patientengut ( $n = 106$ ) auf genetische Varianten hin untersucht. Zuerst wurden einzelne Fragmente (durchschnittliche Fragmentgröße: 160-299 Bp) mittels Exon-flankierender Primer amplifiziert. Im Anschluß daran erfolgte eine systematische SSCP-Analyse der erhaltenen Fragmente bei jeweils zwei unterschiedlichen Umgebungstemperaturen (Raumtemperatur (RT) und  $4^{\circ}\text{C}$ ). Nach der Gelelektrophorese wurden die Gele mit SYBR®-Gold gefärbt und anschließend auf Laufmusterabweichungen hin untersucht. Abweichend von gesunden Kontrollen laufende PCR-Produkte wurden direkt sequenziert (ABI PRISM™ BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaktion Kit, ABI Genetic Analyzer 310; ABI Perkin Elmer, Weiterstadt) und die Ergebnisse mittels einer ergänzenden zweiten Methode (RFLP oder wiederholte Sequenzierung unabhängig voneinander gewonnener PCR-Produkte) abgesichert. Zur Analyse der aberranten Transkripte wurde RNA aus Lymphozyten der betroffenen Person isoliert (mittels Trizol®-Reagenz, Invitrogen, Karlsruhe). Die RNA wurde revers-

transkribiert und die Produkte mittels RT-PCR amplifiziert. Die entstandenen RT-PCR-Produkte wurden anschließend sequenziert (ABI Genetic Analyser 310).

Die in der vorliegenden Dissertation untersuchten Patienten sind vor der Blutentnahme über die geplanten molekulargenetischen Untersuchungen informiert worden und haben ihr schriftliches Einverständnis zur Verwendung ihrer DNA für diese Studie gegeben. Die Studie wurde von der Ethikkommission der Charité, Campus Virchow-Klinikum, Humboldt Universität Berlin genehmigt.

## **2.2 Isolierung und Aufarbeitung menschlicher DNA**

Die genomische DNA wurde aus den kernhaltigen Leukozyten von frischem und eingefrorenem Blut nach einem modifizierten Protokoll von Miller et al. (1988) isoliert. Die Aufarbeitung der DNA wurde nach folgendem Standardprotokoll durchgeführt:

1. 10 ml Frischblut wurden mit 30 ml Frischlysispuffer (155 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 10 mM  $\text{KHCO}_3$ , 0,1 mM EDTA) gemischt, 15 min auf Eis lysiert und anschließend für 15 min bei 4°C bei 1300 rpm zentrifugiert.
2. Der Überstand wurde vorsichtig abgegossen und das entstandene Leukozytenpellet mit 2 ml Frischlysispuffer gespült.
3. Das Pellet wurde in 8 ml Lösung B (400 mM Tris-HCl, 60 mM EDTA, 150 mM NaCl, 1% SDS) vollständig gelöst.
4. 2,7 ml Lösung C (3.6 M Na-Perchlorat) wurden zu dem gelösten Pellet gegeben.
5. Nach der Zugabe von 8 ml Chloroform wurde der Überstand ohne Interphase vorsichtig abpipettiert.
6. Zur Präzipitation der DNA wurde 1 Volumen eiskaltes Isopropanol zugegeben.
7. Im Anschluss wurde der DNA-Faden vorsichtig mit einem Glashaken aufgenommen, in 70%igen Ethanol gewaschen und anschließend in 400  $\mu\text{l}$  TE-Puffer gelöst.

Die Bestimmung der Konzentration und Reinheit der isolierten DNA erfolgte anschließend durch spektrometrische Messung bei 260 nm und 280 nm.

Aus Frischblut wurden Leukozyten wiederum nach einem modifizierten Protokoll von Miller et al. (1988) isoliert. Das Leukozyten-Pellet wurde in PBS gewaschen und resuspendiert. Zur Verminderung der Nuklease-Aktivität wurden alle weiteren Schritte auf Eis ausgeführt. Um einen Abbau der RNA durch ubiquitär vorkommende RNAsen zu vermeiden, wurden mit DEPC (Diethylpyrocarbonat) vorbehandelte Reaktionsgefäße verwendet. DEPC ist ein unspezifischer Ribonukleasen-Inhibitor.

Das resuspendierte Leukozyten-Pellet wurde mit Trizol® versetzt, geschüttelt und nach Zugabe von Chloroform inkubiert.

1. Nach 20 Minuten Zentrifugation bei 1300 rpm wurde die obere, wässrige Phase in ein neues DEPC-behandeltes Reaktionsgefäß überführt und mit 70%-igem Ethanol gewaschen.
2. Nach erneutem Zentrifugieren (20 min bei 1300 rpm) wurde das entstandene RNA-Pellet an der Luft getrocknet und in DEPC-behandeltem Wasser gelöst.

Menge und Reinheit der so gewonnenen RNA wurden photometrisch gegen DEPC-H<sub>2</sub>O als Referenzwert bestimmt.

### **2.3 Polymerasenkettenreaktion (PCR – Polymerase Chain Reaction)**

Mittels der PCR nach Mullis et al. (1987) kann in kurzer Zeit jede beliebige DNA-Sequenz - selbst hochkomplexer Genome - amplifiziert werden. Bei diesem zyklischen Verfahren, bei dem sich bei jedem Durchlauf die Anzahl der DNA-Kopien verdoppelt, benötigt man zwei Oligonukleotide (Primer), die die zu vervielfältigenden DNA-Abschnitte jeweils vom 5'- und 3'-Ende her einrahmen. Der Vorwärts-(forward)-Primer wird dabei komplementär zur Sequenz am 3'-Ende des Antisense-Stranges und der Rückwärts-(reverse)-Primer komplementär zur Sequenz am 5'-Ende des Sense-Stranges ausgewählt (Saiki et al., 1988; Orita et al., 1989). Mittels des Computerprogramms Primer3 (V5.0, aktuelle Versionen erhältlich unter [http://frodo.wi.mit.edu/primer3/primer3\\_code.html](http://frodo.wi.mit.edu/primer3/primer3_code.html)) wurden aus der veröffentlichten Sequenz des MYBP-C-Gens (Carrier et al., 1997) Primerpaare ausgewählt, die PCR-Fragmente von 160-300 Bp Länge amplifizieren. Die Primerpaare wurden so ausgewählt, dass die Spleiss-Stellen mit untersucht wurden. Die Parameter zur Auswahl der Primer lauteten:

- Schmelztemperatur: 57-63°C
- Länge des Primers: 18-24 Nukleotide
- GC-Gehalt : 40-60%
- Fragmentlänge: 180-280 Nukleotide
- möglichst geringe Sekundärstrukturbildung und 3'-Selbstkomplementarität

Für die optimalen PCR-Ergebnisse jedes PCR-Fragmentes mussten erst die spezifischen Bedingungen (Annealing-Temperatur, Primer und DNA-Menge) experimentell ermittelt werden.

Ein PCR-Standardansatz mit einem Gesamtvolumen von 25  $\mu$ l enthielt folgende

Reagenzien:

2, 5 $\mu$ l	PCR-Puffer [50 mM KCL; 10 mM Tris-HCL (pH = 8,5) 1, 5 mM MgCl <sub>2</sub> ; 0,01% Gelatine ]
4,0 $\mu$ l	dNTPs (jeweils 200 $\mu$ M dATP, dCTP, dGTP; dTTP)
0,2 $\mu$ l	<i>Taq</i> -Polymerase (5U/ $\mu$ l)
3 $\mu$ l	Forward-Primer (10 pmol/ $\mu$ l)
3 $\mu$ l	Reverse-Primer (10 pmol/ $\mu$ l)
3 $\mu$ l	DNA (20 ng/ml)
Ad 25 $\mu$ l	Aqua bidest.

Die PCR-Reaktion wurde in einem Thermozykler (Perkin Elmer Amp 9600™) nach folgendem Standardprotokoll durchgeführt :

	Dauer	Temperatur	Funktion	Anzahl der Zyklen
<b>I</b>	5 min	94°C	initiale Denaturierung	1
<b>II</b>	20 sec	94°C	Denaturierung	35
	20 sec	(Tabelle)	Primer-Annealing	
	20 sec	72°C	Elongation	
<b>III</b>	5 min	72°C	finaler Elongationsschritt	1

### 2.3.1 Reverse Transkription (RT-PCR)

Da die uracilhaltige RNA nicht direkt als Matrix für die Taq-Polymerase dienen kann, muss diese durch reverse Transkription in cDNA (complementary-DNA) umgeschrieben werden, bevor sie in einer PCR-Reaktion amplifiziert werden kann. Die Kombination aus reverser Transkription (rT) und PCR wird als RT-PCR bezeichnet. Die Verwendung von cDNA zur Untersuchung bestimmter Gene hat den Vorteil, dass eine ineffektive Amplifikation langer DNA-Fragmente mit großen Intron-Sequenzen umgangen werden kann. Als Zusatzinformation erhält man unter Umständen Hinweise auf alternative Transkripte.

Ermöglicht wird die reverse Transkription durch den Einsatz einer hitzestabilen DNA-Polymerase des Bakteriums *Thermus thermophilus* (Superscript™, Gibco BRL), das effektiv RNA ablesen kann und eine hohe reverse Transkriptase-Aktivität besitzt. Initiiert wird die reverse Transkription durch hexamere Zufallsprimer. Dadurch wird die gesamte RNA in cDNA umgeschrieben und kann danach in einer Standard-PCR verwendet werden. Um eine Transkription von DNA-Kontaminanten zu verhindern, wird der RNA eine RNase-freie DNase (RNasin®, Promega, Mannheim) zugesetzt.

### **2.3.2 Durchführung der RT-PCR:**

1. 500 ng der isolierten RNA wurden in 10 µl DEPC-Wasser gelöst, mit 500 ng Random-Primer versetzt und bei 70°C für 10 min inkubiert.
2. Die Proben wurden anschließend bis Schritt 5 auf Eis gelagert und mit je 9 µl Mastermix versetzt.
3. Der Mastermix enthielt:  
  
4 µl      5x rT-Puffer  
  
2 µl      0,1 M DTT  
  
1 µl      RNasin (2 U/µl)  
  
1 µl      dNTPs (0,5 mM)
4. Zum Schluss wurde noch je 1 µl Superscript™ (10 U/µl) pro Probe hinzugegeben und kurz anzentrifugiert.
5. Nach zehnmütiger Inkubation bei Raumtemperatur (RT) folgte eine Inkubation für 50 Minuten bei 42°C. In dieser Zeit findet die reverse Transkription statt.
6. Nach Abschluss der reversen Transkription wurden alle Enzyme bei 95°C (5 min) denaturiert .

### **2.3.3 Agarose-Gelelektrophorese der PCR-Produkte**

Zur Abschätzung der Länge und Quantität der PCR-Produkte wurden diese elektrophoretisch auf einem 1,2 %igen Agarosegel aufgetrennt.

0,4 g	Agarose
30 ml	1x TBE (0,1 M Tris Base; 0,1 Borsäure; 0,002M Tritriplex III)
2,5 µl	Ethidiumbromid (0.7 µg/µl)

jeweils 4 µl PCR-Produkt wurden mit 4 µl Agarose-Probenpuffer bestehend aus:

20 ml	10x TBE
40 ml	20% Ficoll 400
10 ml	Bromphenolblau (0.1% Lösung)
Ad	100 ml aqua dest.

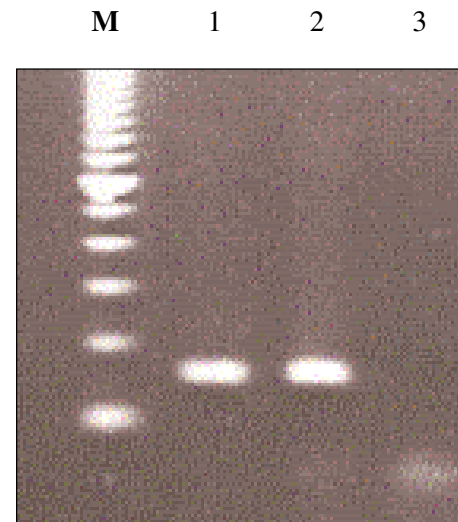
versetzt, auf das Agarosegel aufgetragen und bei 120 Volt für 20 min in einer Gibco BRL Horizon 58™ Elektrophoresekammer aufgetrennt. Als Längenstandard diente eine 100-Bp DNA-Leiter (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot). Die durch das Ethidiumbromid angefärbte DNA wurde auf einem Transluminator durch UV-Licht sichtbar gemacht und das Ergebnis mittels einer Videodokumentationsanlage der Firma Biometra, Göttingen aufgezeichnet.

Um die unspezifische Amplifikation von Kontaminationen festzustellen wurde immer eine sog. Negativkontrolle (enthält H<sub>2</sub>O anstatt DNA) mit den DNA-Proben zusammen amplifiziert und auf dem Agarosegel aufgetrennt (Abb.2).

**Abb. 2:** PCR Exon 20.

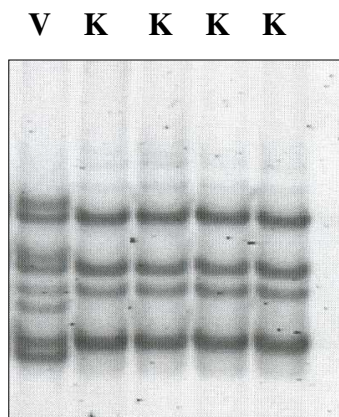
Primerpaar 20 F/R, Fragmentlänge 161 Bp.

M=100 Bp Längenstandard, 1, 2 = PCR-Produkte, 3 = Negativkontrolle



## 2.4 Single-Strand Conformational Polymorphism (SSCP)-Analyse

Zur Suche nach Mutationen wurde eine SSCP-Analyse (single-strand-conformational-polymorphism) durchgeführt. Bei dieser Methode werden die PCR-Fragmente durch Hitze denaturiert und anschließend werden die einzelsträngigen DNA-Fragmente unter nicht-denaturierenden Bedingungen in einem Polyacrylamid-Gel elektrophoretisch aufgetrennt (Abb. 3).



**Abb.3:** SSCP-Analyse der DNA von 5 Patienten mit Vorkommen einer Variante. V = Variante, K = Kontrolle



Es werden schon Unterschiede in der DNA-Sequenz von einer einzelnen Base erkannt. Das Prinzip der SSCP beruht darauf, daß sich bei einer Mutation die Laufgeschwindigkeit des Amplifikates im Gel (Orita et al., 1989) verändert.

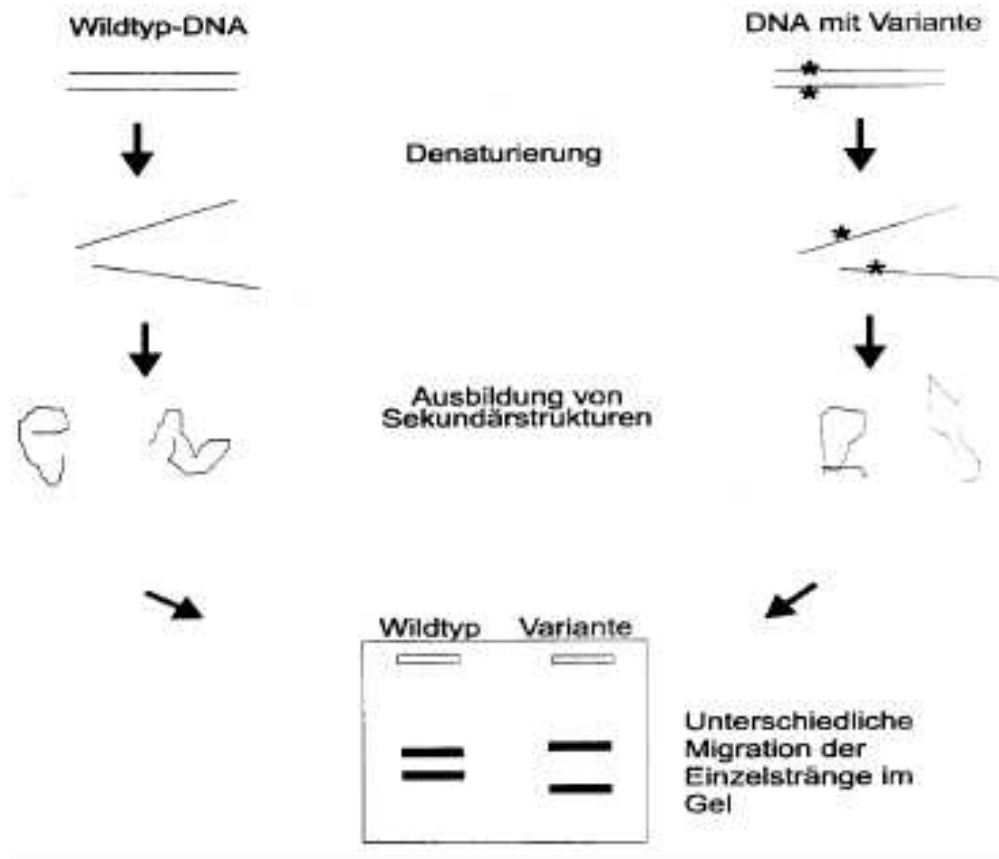
Polyacrylamid entsteht durch Kopolymerisation von Acrylamid (AA) und Bis-Acrylamid (BA) in Pufferlösung. Die Polymerisation wird durch die Zugabe von Ammoniumpersulfat (APS) gestartet und durch Tetramethyldiamin (TEMED) katalysiert. Die hier verwendete 10 %ige Polyacrylamidgel-Stocklösung wurde nach folgendem Rezept hergestellt:

122,5 ml	40 % Acrylamid
50 ml	2 % Bisacrylamid
25 ml	10x TBE
500 µl	0,1 % TEMED
ad 500 ml	H <sub>2</sub> O

#### **2.4.1 Durchführung der SSCP-Analyse**

1. Pro Gel wurden 20 ml Gelstocklösung mit 300 µl 10 %iger APS-Lösung versetzt, gemischt und anschließend in das vorbereitete Glasplattensystem der Firma Biometra gegossen (Multigel-Long™). Die Polymerisation der Gele war nach ca. 30 Minuten abgeschlossen.

2. 8 µl des PCR-Amplifikates wurden mit 12 µl eines formamidhaltigen Gelladepuffers (6 Teile Formamid, 1 Teil Agaroseladepuffer) gemischt. 5 min bei 95°C denaturiert und anschließend auf Eis gelagert.



**Abb. 4:** Schematische Darstellung des Prinzips der SSCP-Analyse (mod. nach Grompe et al., 1993).

3. Jeweils 8 µl Probe werden auf die vorbereiteten Gele aufgetragen und parallel bei RT und 4°C über Nacht elektrophoretisch aufgetrennt.

#### 2.4.2 SYBR®-Gold-Färbung

Die PAA-Gele, die für die SSCP- oder die RFLP-Analyse verwendet wurden, wurden zur Sichtbarmachung der DNA-Fragmente mit SYBR®-Gold (C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>OS, M<sub>w</sub>=78.13) gefärbt. Die Färbung mit SYBR®-Gold ist eine neue Methode zur Visualisierung und

Dokumentation der PAA-Gele. Der verwendete Farbstoff hat fluoreszierende Eigenschaften und interkaliert gemeinsam mit dem DMSO in die DNA-Fragmente. Im Fluor-Imager™ SI System (Amersham, GE Healthcare München) wird das Gel mit einem Laser im ultravioletten Spektralbereich bestrahlt. Der Laser regt das fluoreszenzgefärbte Gel zur langwelligen Sekundärstrahlung an. Das Fluor-Imager™ SI System erfaßt die freigesetzte Fluoreszenz quantitativ und erstellt nach Subtraktion des anregenden Lichts mittels eines 530 nm-Filters ein Punkt-für-Punkt-Bild, welches anschließend in eine TIFF-Datei konvertiert wird, die allen üblichen EDV-Anwendungen zur Verfügung steht.

Die Methode ist einfacher, schneller und sensitiver (Nachweisgrenze: ca.40 pg je Bande) als die konventionelle Silberfärbung (0.1-1.0 ng). Die SYBR®/DMSO-Stocklösung ist 10,000x konzentriert, das Konzentrat (500µl) ist ausreichend für die Färbung von ca. 100 PAA-Gelen.

### **2.4.3 Durchführung der Färbung**

1. Nach der Beendigung der Elektrophorese wurde die vordere Glasplatte entfernt.
2. Das Gel wurde in der horizontalen Lage mit 3-5 ml SYBR®-Gold-Lösung (5 µl SYBR®Gold, 50 ml 1x TBE, pH=8) gleichmäßig benetzt.
3. Nach 10-20 min wurde das Gel mit Hilfe eines geeigneten Gelträgers in den Fluor-Imager™ SI-Scanner eingeführt und eingescannt.

### **2.5 Sequenzierung**

Die Sequenzierung dient in unserem Fall der Bestimmung der Nukleotidabfolge von PCR-Produkten, welche z.B. in der SSCP-Analyse ein abweichendes Bandmuster aufwiesen. Die Sequenzierung selbst hat als Screening-Methode für Mutationen zwar eine hohe Detektionsrate, ist aber zeitaufwändig und kostenintensiv und somit zum schnellen Durchmustern von ganzen Genen, die oft mehrere tausend Basenpaare lang sind, an einem großen Kollektiv nicht geeignet.

Die heute am häufigsten verwendete Methode der Sequenzbestimmung ist die Dideoxy-Kettenterminationsmethode (engl.: „chain termination method“) nach Sanger. Bei dieser Methode wird von einem Primer aus mit Hilfe von DNA-Polymerase an einer Einzelstrang-DNA ein komplementärer Strang synthetisiert. Diese Synthese erfolgt in Gegenwart von Nucleotidtriphosphaten, denen in niedriger Konzentration fluoreszenzmarkierte Dideoxynucleotide (ddNTPs) beigefügt sind. Diesen Nucleotiden fehlt am 3`-Ende der Desoxyribose eine Hydroxylgruppe, so dass hier keine weiteren Nucleotide angefügt werden können. Zur Fluoreszenz-Sequenzierung wird eine AmpliTaq® Polymerase FS verwendet, bei der es sich um eine Doppelmutante handelt. Durch die erste Mutation (G46D) verliert das Enzym seine 5`-3`-Nuclease-Aktivität. Die zweite Mutation im aktiven Zentrum des Enzyms (F667J) führt zu einer Veränderung der Akzeptanz gegenüber Dideoxynucleotiden, so dass diese leichter eingebaut werden. Die Dideoxynucleotide, die mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert sind (Dye-Terminatoren), werden nach dem Zufallsprinzip in den neusynthetisierten Strang eingebaut und führen zum Abbruch der DNA-Synthese. So entsteht eine Mischung neusynthetisierter DNA-Stränge unterschiedlicher Länge mit einem Größenbereich zwischen einem und mehreren hundert Nucleotiden, die an den Primer angehängt sind. Diese werden in einem Sequenzierungsgel nach ihrer Länge fraktioniert. Da jedes Dideoxynucleotid (ddA, ddG, ddC oder ddT) mit einem andern Farbstoff markiert ist, ist die Fluoreszenz an der Stelle des Kettenabbruches charakteristisch für das jeweilige Nucleotid an dieser Stelle der DNA.

Nach der gelelektrophoretischen Auftrennung des erhaltenen PCR-Produktes wird an Hand des Fluoreszenzmusters nun die Basensequenz der eingesetzten DNA durch das ABI PRISM™ Sequencing System automatisch analysiert.

### 2.5.1 Aufreinigung des PCR-Produktes

Das zu sequenzierende PCR Produkt wurde zuvor mit dem Invisorb® Spin PCRapid Kit von InViTek (Berlin) nach Herstellerangaben aufgereinigt. Mit diesem Kit werden PCR-Amplifikate von Puffer, Salzen, Nukleotiden, Primern und Polymerasen gereinigt. Die gereinigte DNA wurde in 10µl 10 mM Tris HCl eluiert und war sofort für die nachfolgende Sequenzierung einsetzbar.

### 2.5.2 Durchführung der Sequenzierungs-PCR

Die Sequenzierungsreaktion wurde mit dem Prism DNA Sequencing Kit Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction™ nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

Für die Sequenzierungs-PCR wurden:

500 ng	aufgereinigte Template-DNA
4 µl	Terminationsmix (ddNTPs, dNTPs, Ampli-Taq-DNA-Polymerase)
1,6 µl	Primer (3,2 pmol)
ad 10 µl	H <sub>2</sub> O

verwendet.

Die PCR wurde anschließend im Perkin Elmer Gene Amp 9600™ nach folgendem Thermoprofil durchgeführt:

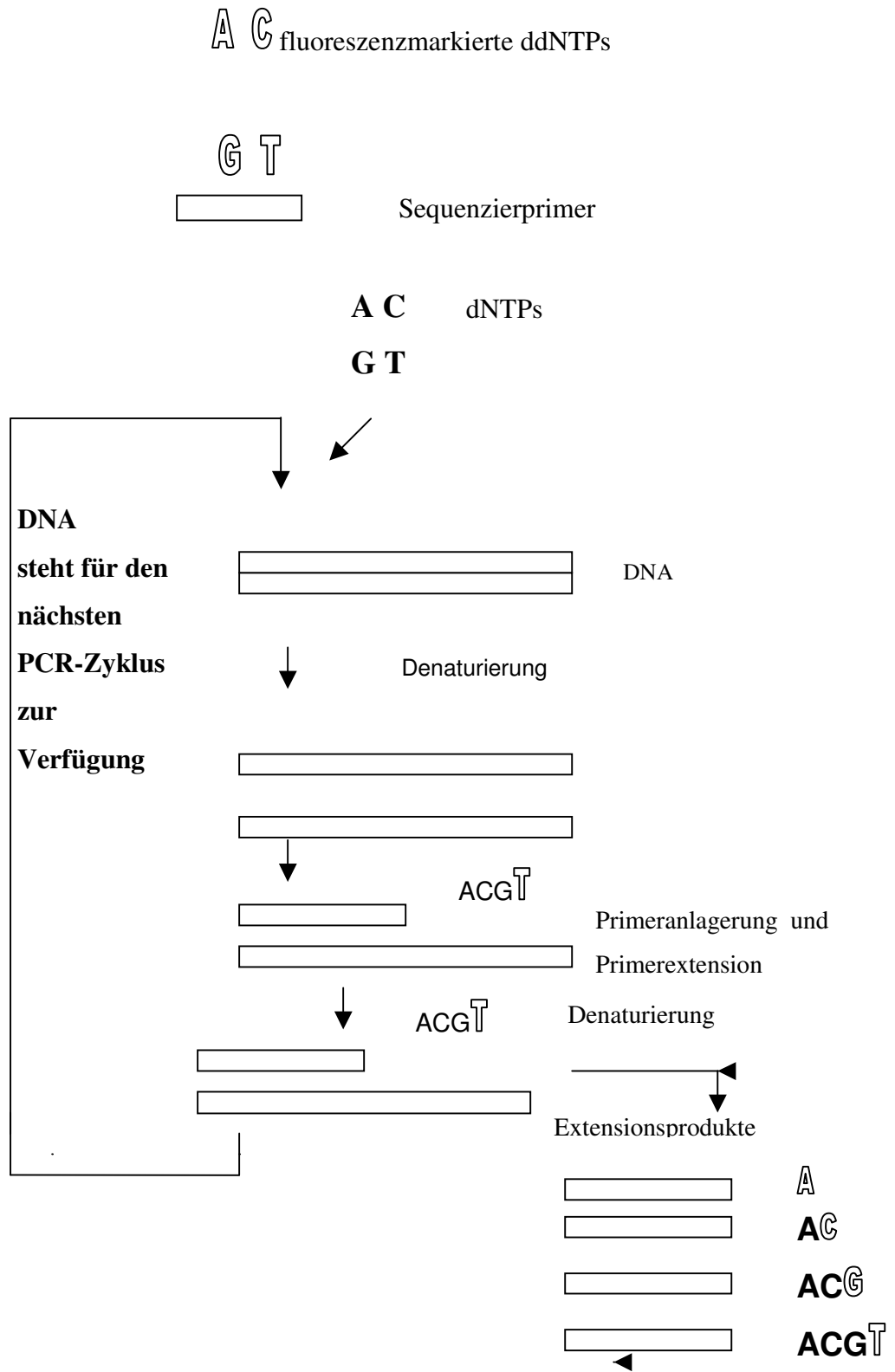
<b>Dauer</b>	<b>Temperatur</b>	<b>Funktion</b>	<b>Anzahl der Zyklen</b>
60 sec	96°C	initiale Denaturierung	1
10 sec	96°C	Denaturierung	
10 sec	50°C	Primer-Annealing	25
240 sec	60°C	Elongation	
∞	4°C	Abkühlung	

Das Produkt aus der Sequenzierungs-PCR wurde hiernach in einer Sephadex® G 50-Säule (über Sigma Aldrich, München) aufgereinigt und in einer Vakuumzentrifuge getrocknet, um überschüssige Primer abzutrennen.

### **2.5.3 Elektrophorese der Sequenzierungsproben**

1. Das Sequenzierungsgel bestand aus 4,5 % Polyacrylamid mit 6M Harnstoff und wurde zwischen Sequenzierplatten der Firma ABI Perkin Elmer (Größe: 25 x 42 cm) auspolymerisiert.
2. Das gereinigte PCR-Produkt wurde zusammen mit 2ml Stopplösung (deionisiertes Formamid / EDTA 25 mM (5:1)) für 2 Minuten bei 90°C denaturiert und danach auf Eis gelagert.
3. Die Sequenzierplatten wurden mit dem Gel in den Sequenzierer eingelegt und die Pufferkammern mit 1 x TBE-Puffer aufgefüllt.

4. Pro Slot wurden 1,5 µl der jeweiligen Probe aufgetragen und bei 2700 V/ 50 W über vier Stunden elektrophoretisch aufgetrennt.
5. Das Fluoreszenzmuster wurde mit Hilfe der Sequenzierersoftware automatisch auf die Basensequenz hin ausgewertet.
6. Die Sequenzierungsergebnisse wurden mittels Restriktionsenzymassay (siehe 2.6) überprüft und bestätigt.



**Abb. 5:** Schematische Darstellung der zyklischen DNA-Sequenzierung nach Sanger et al. (1977). Der Sequenzierprimer wird bei der Sequenzierung-PCR nach Anlagerung an den komplementären DNA-Strang verlängert, bis es durch den Einbau eines ddNTPs zum Kettenabbruch kommt.



## **2.6 Restriktionsfragmentlängen-Polymorphismus (RFLP)-Analyse**

Restriktionsendonukleasen schneiden Doppelstrang-DNA an einer bestimmten Stelle innerhalb oder in einem bestimmten Abstand zu einer spezifischen Erkennungssequenz. Liegt die polymorphe DNA-Region einer Variante im Bereich der Erkennungssequenz einer Restriktionsendonuklease, so ändert sich dadurch das Schnittmuster der Restriktionsendonuklease, was zu Restriktionsfragmenten unterschiedlicher Länge führt (Polymorphismen).

Durch die Restriktionsfragment-Längen-Polymorphismus-Analyse (RFLP) können in der SSCP-Analyse gefundene und durch DNA-Sequenzierung charakterisierte Varianten unabhängig bestätigt werden (Cooper et. al.1984). Es ist eine schnelle und robuste Methode zur Genotypisierung bekannter Varianten in ausgesuchten Kollektiven. Ebenso kann man durch die Sequenzierung erhaltene DNA-Sequenzen bestätigen, indem man mit Hilfe des Computerprogramms Mapsort™ eine geeignete Schnittstelle in der erhaltenen Sequenz bestimmt und das Amplifikat mit der bestimmten Restriktionsendonuklease verdaut. Bei mit der Vorhersage übereinstimmender DNA-Sequenz erhält man nun die erwarteten Schnittfragmente.

### **2.6.1 Durchführung der RFLP-Analyse**

Zur Auswahl möglicher Restriktionsenzyme wurde die Sequenz eines ca. 30 Bp langen Genabschnittes beider betreffender Allele in eine Datenbank mit einer großen Anzahl bekannter Restriktionsendonukleasen eingegeben. Mit Mapsort™ konnte ein Verdau mit zahlreichen Endonukleasen im Computer simuliert werden. Aus den Enzymen, die selektiv nur eines der beiden Allele schnitten, wurde nach den Kriterien der kommerziellen Verfügbarkeit und der Kostengünstigkeit ein entsprechendes Enzym ausgewählt.

Mastermix für den Restriktionsverdau:

1,5 µl	spezifischer Puffer (abhängig vom jew. Enzym)
1.0 µl	Enzym (10 U/µl)
5,0 µl	PCR-Produkt
ad 10 µl	H <sub>2</sub> O

Der Reaktionsansatz wurde gemischt und bei der nach Angaben des Herstellers optimalen Temperatur für mindestens 2 Stunden inkubiert.

Die verschiedenen Restriktionsfragmente wurden auf einem Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt. Durch SYBR®-Gold-Färbung wurden die Banden sichtbar gemacht.

Nun konnte anhand des spezifischen Bandenmusters jede Probe einem bestimmten Genotyp zugeordnet werden.

## **2.7 Haplotypanalyse**

Für die Haplotypanalyse zum Nachweis eines Foundereffektes wurden insgesamt drei Mikrosatelliten die das MYBP-C-Gen überspannen typisiert. Zwei Marker (D11S1385 und D11S1313 flankieren das Gen, der dritte Marker ist im MYBP-C-Gen lokalisiert und besitzt zur Zeit noch keine D-Nummer. Die Typisierung erfolgte in Zusammenarbeit mit dem Institut für Humangenetik.

## **2.8 Statistik**

Bei den beobachteten Polymorphismen wurde die Häufigkeit der auftretenden Allele im Patientenkollektiv und in der Kontrollgruppe einzeln berechnet. Mit Hilfe des Hardy-Weinberg-Gesetzes wurde überprüft, ob sich die verschiedenen Genotypen im Gleichgewicht befinden.

### 2.8.1 Allelhäufigkeit

Die Häufigkeit, mit der ein Allel an einem gegebenen Genlocus in einer Population vertreten ist, bezeichnet man als Allelhäufigkeit (auch Genfrequenz genannt). Die Häufigkeit der einzelnen Allele kann in einer Population sehr verschieden sein. Die Allelfrequenz hat immer einen Wert zwischen 0 und 1. Ist die Allelfrequenz = 1, so sind alle untersuchten Personen homozygot für dieses Allel. Bei einer Frequenz = 0 ist keine Person Träger dieses Allels. Für zwei Allelhäufigkeiten p und q gilt unabhängig von der Länge der Allele:  $p + q = 1$  (100%).

Die Allelfrequenz wird nach folgender Formel berechnet:

$$p(A) = \frac{2n_{AA} + n_{AB}}{2n} \quad \text{u.} \quad q(B) = 1 - p$$

p = Häufigkeit des Allels A

n = Anzahl der untersuchten Personen

AA = Personen, die homozygot sind für Allel A

AB = Personen, die heterozygot sind

q = Häufigkeit des Allels B

### 2.8.2 Hardy-Weinberg-Gleichgewicht

Nach dem Hardy-Weinberg-Gleichgewicht sind die Allelhäufigkeiten und ihre Genotypenhäufigkeiten unter bestimmten gleichen äußeren Bedingungen von Generation zu Generation gleich. Dabei werden Ausschluss von Selektion, Panmixie (zufällige, uneingeschränkte Paarung), gleiche Überlebenschancen und gleiche Fruchtbarkeit in der Generationenfolge vorausgesetzt.

Aus der ermittelten Allelfrequenz wurde mittels des Hardy-Weinberg-Gesetzes die erwartete Häufigkeit der Genotypen berechnet und der tatsächlich beobachteten gegenübergestellt:

$$p^2 + 2pq + q^2 = 1$$

$p^2$  = erwartete Häufigkeiten des Genotyps AA (homozygot für das Allel A)

$2pq$  = erwartete Häufigkeiten des Genotyps AB (heterozygot)

$q^2$  = erwartete Häufigkeiten des Genotyps BB (homozygot für das Allel B)

### 2.8.3 $\chi^2$ - Test

Mittels des  $\chi^2$ -Tests wird abgeschätzt, ob eine Abweichung zwischen der beobachteten und der erwarteten Allelfrequenz mit zwei Freiheitsgraden (2df) zufällig ist oder ob die Hypothese, die der erwarteten Allelfrequenz zugrundeliegt, verworfen werden muß.

$\chi^2$  wird nach folgender Gleichung berechnet:

$$\chi^2 = \sum \frac{(B - E)^2}{E}$$

**B** = beobachtete Häufigkeit

**E** = erwartete Häufigkeit

Die  $\chi^2$ -Verteilung bei verschiedenen Freiheitsgraden ist tabellarisch verfügbar. Aus diesen Tabellen läßt sich für einen bei gegebenem Freiheitsgrad errechneten  $\chi^2$ -Wert die Wahrscheinlichkeit **p** (engl. "probability") ablesen, daß die Abweichung von erwarteter und beobachteter Allelfrequenz zufällig aufgetreten ist. Je höher die Wahrscheinlichkeit, je größer also der Wert von **p**, desto verlässlicher entsprechen die experimentellen Daten der aufgestellten Nullhypothese. Ein Wert von **p**  $\geq$  **0.05** wird als statistisch signifikant angesehen (d.h. Werte, die in einem solchen p-Wertbereich fallen, sprechen mit großer Wahrscheinlichkeit für die Richtigkeit der Nullhypothese (Hennig, 1998).

***Beispiele:***

**$\chi^2 = 0$ :** völlige Übereinstimmung der beobachteten und erwarteten Häufigkeit

**$\chi^2 \geq 3.84$ :** signifikante Abweichung der beobachteten Häufigkeiten von den Gesetzmäßigkeiten des Hardy-Weinberg-Gesetzes (es besteht jedoch bei  $p \geq 0.05$  eine 5%ige Irrtumswahrscheinlichkeit )

**$\chi^2 \geq 6.63$ :** völlige Übereinstimmung der beobachteten und erwarteten Häufigkeit

## 2.9 Materialien

### 2.9.1 Geräte

Autoklav	Varioklav, Typ500, H+PLabortechnik, München
Brutschrank	Heraeus Instruments UT 20, Berlin
Elektrophoresekammern	GNA 200, Pharmacia LKB, Freiburg
	Horizon 58, Gibco BRL, Eggenstein
	Multigel-Long Typ G 47, Biometra, Göttingen
Fluorimager™ SI System	Molecular Dynamics, Amersham, GE Healthcare, München
Geldokumentationsanlage	TI 3 BioDoc II™, Bio Doc CCD-Camera Biometra, Göttingen
Laborwaage	Typ 1712004, Sartorius, Göttingen
Magnetrührer	MR 3001 K, Heidolph, München
Mikrowelle	Micromat, AEG
PCR-Gerät	Gene Amp PCR System 9600, Perkin Elmer, Weiterstadt
pH-Meter	Delta 320, Mettler
Photometer	Lumat LB 9501, Berthold, Bad Wildbad
Schüttelinkubator	Model 3033, GFL, Burgwedel
Schüttler	SM 25, Bühler, Tübingen
Sequenzierer	ABI Prism™ 377 DNA- Sequencer, Perkin Elmer, Weiterstadt
Spannungsgeräte	Elektrophoresis Power Supply EPS 200, Pharmacia Biotech, Freiburg
Vortex Mixer	Reax 2000, Heidolph, München
Wasserbad	Typ WB 7, Memmert, Schwabach
Zentrifuge	Centrifuge 5417 C, Eppendorf, Hamburg

## 2.9.2 Chemikalien

Es wurden nach Möglichkeit Chemikalien mit der Qualitätsbezeichnung „pro analysi“ verwendet.

Amresco, Ohio	Acryl-40 Solution, Bis-2 Solution
Biozym, Hameln	universal-Agarose
Boehringer, Mannheim	dNTPs (Desoxy-Nukleotidtriphosphat)
Braun, Melsungen	Aqua ad iniectabilia
Gibco BRL, Eggenstein	LB-Agar (Lennox L Agar)
Merck, Darmstadt	Borsäure, Tritriplex III (Ethylendinitrilotetra- Essigsäure, Dinatriumsalz-Dihydrat), Tris-Base [(Trishydroxymethyl)-aminomethan]
Sigma Aldrich, München	Bromphenolblau, 5-Bromo-4-Chloro- 3-Indolyl- $\beta$ -D-Galactopyranoside, TEMED (N,N,N',N' - Tetramethylethylenediamin)

## 2.9.3 Sonstiges

Filterpapier	Whatman 3 MM GF/C Filter Whatman Nr. 1822915, Maidstone, England
Gelfilter	Quiagen-tip 20®, Quiagen, Hilden
Kits	PRISM™ DNA Sequencing Kit Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction™, ABI Perkin Elmer, Weiterstadt Invisorb® Spin PCRapid Kit, InViTek, Berlin

## 2.9.4 Synthetische Oligonukleotide (Primer)

Alle verwendeten Primer wurden mit Hilfe des Computerprogrammes Primer (Version 5.0) ausgewählt. Als Grundlage dienten die von Gautel et al. (1995) , Niimura et al. (1998) und Carrier et al. (1997) veröffentlichten Sequenzen des humanen Myosinbindungsprotein-C3-Gens. Die Synthese erfolgte durch die Firma Applied Biosystems (Weiterstadt).

**Tab. 2:** Synthetische Oligonukleotide (Primer) zur Amplifikation des MYBP-C-Gens.

Exon	Sequenz	Position	Größe	Anealing-Temperatur
6 F	ATT ACA GGC CTG AGC CAC C	4067 → 4085	291	72°C
6 R	GAG GTA GGA GAC CAG GAC CC	4357 → 4338		
7 F	CAT GAA TGG GCA AGT CTG TG	47 06 → 4725	210	66°C
7 R	GAA GGG CCT CAG ACT CCA G	4915 → 48 97		
8 F	GAG TCT GAG GCC CTT CAG G	49 00 → 4918	259	64°C
8 R	GGG AGA AAG GGA CAC TAG CC	5158 → 5139		
9 F	CCT GCT CCT AAT CCC TTT CC	51 77 → 5196	223	64°C
9 R	TCA GAG AGG TGC AGT GTT GTG	53 99 → 5379		
10I F	GGACCTCCTATCAGCCTTCC	827 → 846	485	58°C
10I R	AGCACTGGCTGATGGTCAG	1311 → 1293		
10 F	AGG GTC TAC CAG GTC GGC	5589 → 5606	234	64°C
10 R	GAC TCA CCC CTG TCC GTG	5822 → 5805		
11 F	AGG TGG CCA TAC CTC TCA TG	6013 → 6032	265	56°C
11 R	CAG GAC CAA GGA GCT GTA GC	6277 → 6258		
12 F	ACA GCC TAG ACT GCG GGA C	6323 → 6341	268	68°C
12 R	GGC TAA CCT ATG CCC TCT CC	6590 → 6571		
13 F	CCA GCC ACA GCC ACA GTA G	8119 → 8137	275	66°C
13 R	AGG AGG CAA GGC TAT GGG	8393 → 8376		
14 F	CTC TCT GGG CCT AAT TTC CC	8443 → 8462	263	60°C
14 R	CTT GGC ACC GAT GGA CTC	8705 → 8688		



Exon	Sequenz	Position	Größe	Anealing-Temperatur
15 F	GGG GCA CAG GGA TTA TCA C	8594 → 8612	282	66°C
15 R	GGT GAG CAT GAG GGT TGG	8875 → 8858		
16 F	AAC CTG GGG AGG AGA TGG	8829 → 8846	296	58°C
16 R	GTA TTT GAA GGT CTC CTC CCG	9124 → 9104		
17 F	AGA GGC CAC AGC ACT TGC	9042 → 9059	290	60°C
17 R	TTG CCT GCT CCC CTA CAG	9331 → 9314		
18 F	CCT CCA CAG GGA TTC ACG	9600 → 9617	299	58°C
18 R	CCC TGT GTC TCT CTC TGT CTCC	9898 → 9877		
19 F	TCA GAA TAC CAA CAA GCC AGG	10462 → 10482	247	63°C
19 R	ACC CTA CCC TGG AGC AGG	10708 → 10691		
20 F	AGC CTG CTC CAG GGT AGG	10689 → 10706	161	58°C
20 R	AAC CAA GAC TCA GGG GCC	10849 → 10832		
21 F	CCC CAG TGA CCT GTG CTC	11969 → 11986	263	58°C
21 R	CTT GGC TGG TTC CAC ACA C	12231 → 12213		

### 3. Ergebnisse

Mittels einer systematischen Mutationssuche im MYBP-C-Gen (Exon 6-21) bei 106 konsekutiven, unverwandten Patienten mit hypertropher Kardiomyopathie konnten wir insgesamt elf krankheitsrelevante Mutationen identifizieren, die bei gesunden Probanden nicht vorkamen. Es handelt sich um fünf Missense-Mutationen mit Aminosäuresubstitution (E258K, R282W, G507R, G523W, C566R), zwei Spleissmutationen (IVS7+1G>A und IVS20-2A>G) und zwei 1-Bp Deletionen (DelC343 und DelC390) und Varianten mit unbekannter Pathogenität (IVS17+11C>G, IVS9-36G>A) (siehe Tab. 3).

Bislang wurde nur die Missense-Mutation E258K von mehreren Autoren unabhängig als HCM-verursachende Variante in der Literatur beschrieben. (Niimura et al. 1998, Van Driest et al. 2004; Richard et al. 2003; Nanni et al. 2003; Alders et al. 2003; Andersen et al. 2004; Erdmann et al. 2003). Die Mutation E258K scheint am häufigsten für hypertrophe Kardiomyopathie verantwortlich zu sein.

Die Missense-Mutation G507R ist von Van Driest et al. (2004) als ein seltener Polymorphismus (d.h. mit einer Frequenz < 1%) vorbeschrieben worden.

Die Variante S236G wurde bereits kontrovers diskutiert – einerseits als eine für HCM verantwortliche Mutation (Morner et al. 2003; Maron et al. 2001; Richard et al. 2003), andererseits als ein neutraler Polymorphismus (Jaaskelainen et al. 2002; Erdmann et al. 2003, Van Driest et al. 2004).

Die übrigen Polymorphismen wurden erstmalig von Erdmann et al. (2003) beschrieben. In der Veröffentlichung fanden auch Ergebnisse aus der vorliegenden Dissertation Berücksichtigung.

Bis auf die Mutation IVS7+1G>A konnte jede Mutation bei nur jeweils einem Indexpatienten identifiziert werden. Zudem gelang uns der Nachweis, dass es sich bei IVS7+1G>A um eine Founder-Mutation handelt (Erdmann et al., 2001).

Neben den oben beschriebenen seltenen Mutationen identifizierten wir insgesamt sieben, teilweise häufige, Polymorphismen (S236G, T262T, R326Q, IVS12-24C/T, IVS13+29G/A, IVS19+47G/A, IVS21+38A/T, siehe Tab.14).

**Tab. 3:** Überblick über die krankheitsrelevanten Mutationen, die in der vorliegenden Arbeit in den Exonen 6-21 des humanen MYBP-C Gens identifiziert wurden (Exonnummerierung nach Carrier et al., 1997).

DNA-Nr.	Mutation	Nukleotid- position	Nach- weis- methode	Position der Mutation/ funktionelle Effekte	Anzahl d. fehlenden AS
1541	E258K	4295 G/A Exon 6	S	Phosphorylierungsstelle / Verlust der Titin- und Myosin- bindungsstelle, Ladungswechsel	
45	R282W	5058 C/T Exon 8	RFLP mit <i>AclI</i>	LAGGRRIS-Loop / Verlust der Phosphorylierungsstelle	
70	G507R	9140 G/A Exon 17	S	Beeinträchtigung der Phosphorylierungsstelle / Ladungswechsel	
1147	G523W	9188 G/T Exon 17	RFLP mit <i>BsrI</i>	Beeinträchtigung der Phosphorylierungsstelle /	
1423	C566R	9738 T/C Exon 18	RFLP mit <i>TaiI</i>	Beeinträchtigung der Phosphorylierungsstelle / Ladungswechsel	
343	IVS9-36G/A	5651 G/A IVS 9	RFLP mit <i>HpaII</i>	wahrscheinlich Verlust der Titin- und Myosinbindungsstellen	
1594	IVS17+11C/G	9256 C/G IVS 17	RFLP mit <i>Sdu I</i>	unbekannt	
1331/ 169	IVS7+1G/A	4861 G/A IVS 7	RFLP mit <i>TaiI</i>	Δ Exon 7, und Δ Exon 7 und 8/ Verlust der Titin- und Myosinbindungsstelle	989 AS/ 1001 AS
14	IVS20-2A/G	12030 A/G IVS 20	RFLP mit <i>PstI</i>	Leserasterverschiebung / Verlust der Titin- und Myosinbindungsstelle	612 AS
1670	DelC343	6747 Exon 12	RFLP mit <i>NlaIII</i>	Leserasterverschiebung / Verlust der Titin- und Myosinbindungsstelle	825 AS
164	DelC390	8276 Exon 13	S	Leserasterverschiebung / Verlust der Titin- und Myosinbindungsstelle	869 AS

S = es wurde nur die Sequenzanalyse durchgeführt (keine RFLP-Analyse).

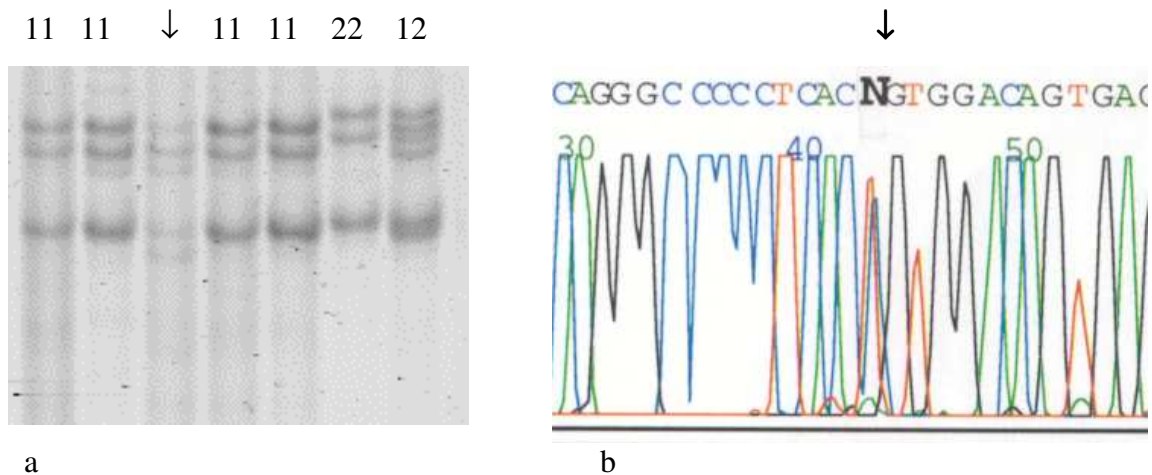
Die Allelfrequenzen dieser häufigen Polymorphismen unterschieden sich nicht zwischen der Patientengruppe und einer Kontrollgruppe bestehend aus 46 gesunden Blutspendern.

### **3.1 Aminosäuresubstitutionen**

Insgesamt haben wir in der vorliegenden Arbeit fünf Aminosäuresubstitutionen (Missense-Mutationen) bei fünf Patienten mit hypertropher Kardiomyopathie identifiziert. Die Missense-Mutationen (E258K, R282W, G507R, G523W, C566R) sind alle in evolutionär konservierten und funktionell bedeutsamen Proteinregionen lokalisiert. Um auszuschließen, dass es sich bei diesen Aminosäuresubstitutionen um Polymorphismen handelt und nicht um krankheitsrelevante Mutationen, genotypisierten wir jeweils 46 gesunde Kontrollen auf Vorhandensein der genetischen Varianten; keine der Missense-Mutationen wurde in unserem Kontrollkollektiv gefunden, in dem knapp 100 Chromosomen untersucht wurden.

#### **3.1.1 Glu258Lys (E258K)**

Bei der SSCP-Analyse von Exon 6 konnte sowohl bei Raumtemperatur als auch bei 4°C eine Laufmusterabweichung bei dem Indexpatienten 1541 festgestellt werden (Abb. 6). Beim aberranten PCR-Fragment konnte mittels DNA-Sequenzierung eine G>A Transition in der Nähe einer Spleiss-Stelle an Position +4295 (Codon 258) identifiziert werden. Durch diese GAG>AAG Substitution kommt es zum Austausch der negativ geladenen sauren Glutaminsäure (GAG) gegen das positiv geladene basische Lysin (AAG).



**Abb.6: a)** SSCP-Analyse von Exon 6 bei RT (+25°C), Pfeil = Variante. 1 = Wildtyp-Allel, 2 = Mutation. 11, 22 = homozygot

**b)** DNA-Sequenzierung (Reverse). Es gibt sowohl einen Peak für C als auch für T im Reverse-Strang, d.h. im Forward-Strang ist an dieser Stelle G bzw. A.

Da diese G>A Transition die Erkennungssequenz der vorhandenen Restriktionsenzyme nicht ändert, konnte eine RFLP-Analyse nicht durchgeführt werden. Das aberrante PCR-Fragment wurde daher zur Kontrolle mehrfach in unabhängigen Proben sequenziert.

Bei dem Indexpatienten, der diese Mutation trägt, handelt es sich um einen 54-jährigen männlichen Patienten (siehe Tab. 4). Eine nichtobstruktive hypertrophe Kardiomyopathie (NHCM) war schon seit seinem 52. Lebensjahr bekannt. Wegen anhaltender ventrikulärer Tachykardien wurde dem Patienten in seinem 54. Lebensjahr ein implantierbarer Cardioverter-Defibrillator (ICD) eingesetzt.

Da die genetische Variante in der Nähe der Spleiss-Stelle ist, könnte sie zu einer Spleissmutation führen. Eine mRNA-Analyse des Patienten zur weiteren Klärung und eine genetische Untersuchung von Familienmitgliedern war leider nicht möglich.

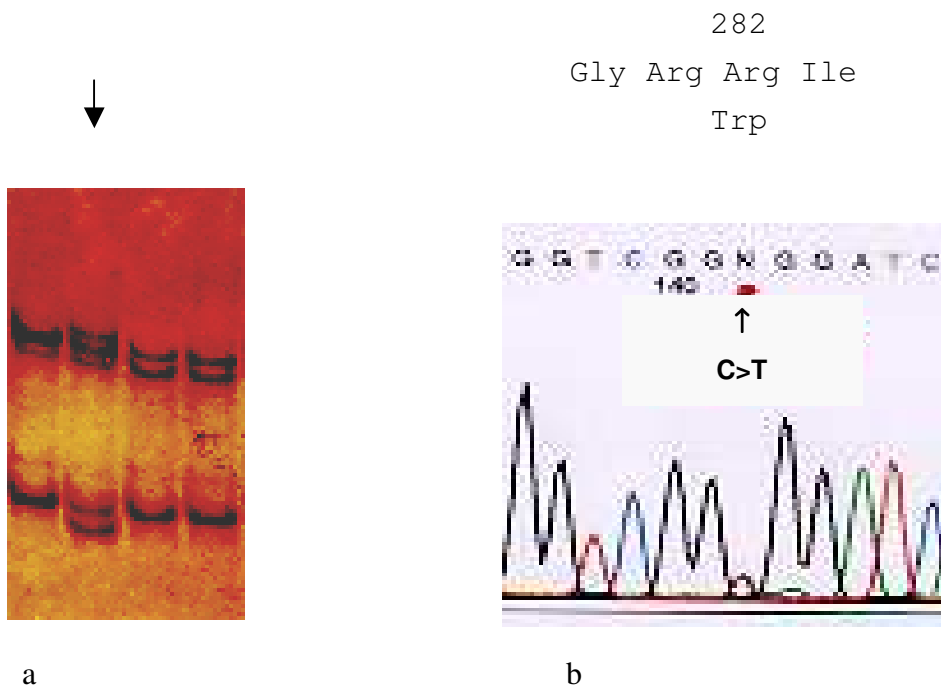
**Tab. 4:** Klinische Merkmale des Indexpatienten 1541 (**E258K**). Die Untersuchung von Angehörigen war nicht möglich.

DNA-Nr.	1541
Geschlecht	M
Alter bei Studieneinschluß	54
Alter bei Erkrankungsbeginn	52
Symptome	Belastungsdyspnoe
ICD-Implantation	1998, 54. Lebensjahr
TASH, Myektomie	Nein
IVS (mm)	23
LVEDD (mm)	39 (nicht vergrößert)
LVEF %	45
SAM	Nein
Gradient (mmHg)	Nein
LAEDD (mm)	52 (vergrößert )

### 3.1.2 Arg282Trp (R282W)

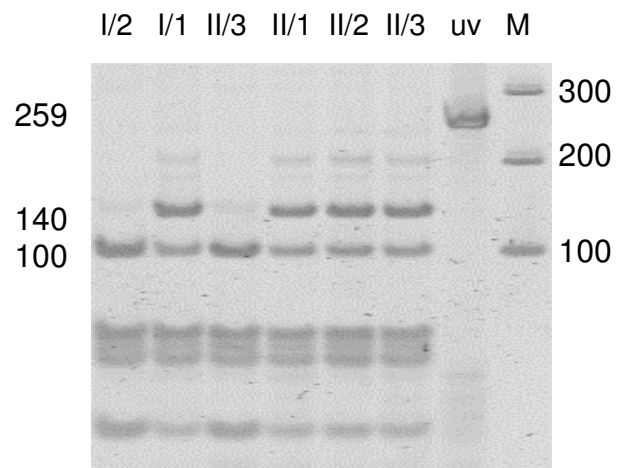
Bei der SSCP-Analyse von Exon 8 fanden wir bei Raumtemperatur eine Laufmusterabweichung bei dem Indexpatienten 45 (Abb.7a). Mittels DNA-Sequenzierung des aberranten PCR-Fragmentes wurde eine C>T Nukleotidsubstitution an Position +5058 (Codon 282) nachgewiesen (Abb.7b). Aufgrund dieser Transition kommt es im betroffenen Codon zum Austausch der positiv geladenen basischen Aminosäure Arginin (CGG) gegen die unpolare neutrale Aminosäure Tryptophan (TGG).

Die C>T Transition in Position +5058 zerstört eine Schnittstelle für die Restriktionsendonuklease *AciI*. Nach Amplifikation mittels der Primer MYBPC-8F/R und anschließender enzymatischer Spaltung durch *AciI* entstehen beim Wildtyp zwei Fragmente mit einer Länge von 100 Bp und 61 Bp (Abb. 7c), bei Vorliegen der Mutation zeigt sich zusätzlich eine unverdaute Bande von 140 Bp Länge.



**Abb. 7 a)** SSCP-Analyse bei Raumtemperatur und **b)** DNA-Sequenzierung

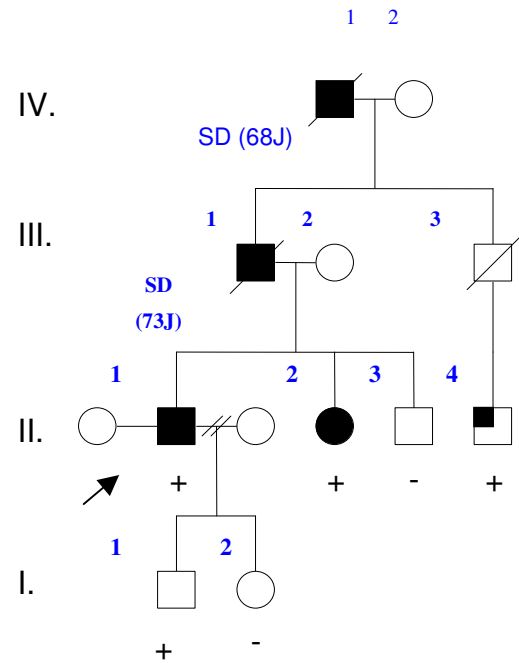
**Abb.7 c)** Gelelektrophoretische Auftrennung (10% PAA-Gel) der PCR-Produkte (Exon 8) nach enzymatischer Spaltung mit *AclI*. Die Probanden I/2 und II/3 sind homozygot für das Wildtyp-Allel (R282), die Probanden I/1, II/1, II/2 und II/4 sind heterozygot und damit Träger der R282W Mutation, uv: unverdautes PCR-Produkt, M: 100-Bp DNA-Marker



**Abb.7 d)** Stammbaum der Familie des Indexpatienten 45 (II/1). Kreis: weiblich; Quadrat: männlich; ausgefülltes Symbol: HCM-Phänotyp; viertel-gefülltes Symbol: einzelne Symptome einer HCM (kein vollausgebildetes Krankheitsbild); +: Mutationsträger; -: genotypisiert, aber kein Mutationsträger; Pfeil: Indexpatient.

II.:1 (DNA 45, Indexpatient), 2 (DNA 1999, Schwester des Indexpatienten), 4 (DNA 1989, Cosin des Indexpatienten).

I.:1 (DNA 2002, Sohn des Indexpatienten ).



Der in dieser Studie etablierte Restriktionsverdau ist geeignet, um weitere Familienmitglieder spezifisch auf das Vorhandensein der Mutation zu testen (Abb. 7c); so konnten wir aus der Familie des Indexpatienten (II/1) fünf weitere Familienmitglieder untersuchen und hiervon drei als Mutationsträger identifizieren (DNA-Nr. 1999, 1989 und 2002) (Abb. 7d).

Die Variante R282W kommt in einer konservierten Stelle vor (siehe Abbildung 8).



menschliches kardiales MYBP-C  
285

SAFRRTSLAGGGR**R**-----I SD

Maus kardiales MYBP-C  
283

SAFRRTSLAGAGGR**R**-----TSD

Huhn kardiales MYBP-C  
281

AAFRRRTSLAGGGR**R**MTSAFLSTE

**Abb. 8:** Homologievergleich zwischen der Proteinsequenz von Mensch, Maus und Huhn. Der Aminosäurerest R282 ist in allen drei Spezies konserviert.

Der Beginn der Krankheit in dieser Familie lag im vierten bis fünften Lebensjahrzehnt, und die Symptome waren mild ausgeprägt. Die ventrikuläre Hypertrophie war mäßig und bei den Patienten traten keine schweren Arrhythmien auf. Dennoch gab es bei zwei älteren Familienmitgliedern plötzliche Todesfälle (Erdmann et al., 2001).

**Tab. 5:** Klinische Merkmale des Indexpatienten 45 (**R282W**) und seiner Angehörigen.

DNA-Nr.	45 (Indexpatient)	2002 (Sohn des Indexpatienten)	1989 (Cosin des Indexpatienten)	1999 (Schwester des Indexpatienten)
Geschlecht	M	M	M	F
Alter bei Studieneinschluß	64	37	60	65
Alter bei Erkrankungsbeginn	43	Kein klinischer Phänotyp	57	59
Symptome	AP/ Dyspnoe	Keine	AF/Dyspnoe	Dyspnoe
ICD,TASH, Myektomie	nein	nein	nein	nein
IVS (mm)	16	nda	†	Ht,†
IVS /P W	1.3	nda	†	Ht,†
LVEDD (mm)	47	nda	†	Ht,†
FS %	46	nda	†	Ht,†
SAM	Ja	nda	†	Ht,†
Gradient (mmHg)	25	nda	†	Ht,†
LVEF(%)	65	nda	†	Ht,†
LVEDVI ( mL <sup>2</sup> )	100	nda	†	Ht,†
LVEDP ( mm Hg )	12	nda	†	Ht,†

### 3.1.3 Gly507Arg (G507R)

Bei der SSCP-Analyse von Exon 17 konnte bei Raumtemperatur eine Laufmusterabweichung bei dem Indexpatienten 70 identifiziert werden (Abbildung 9). Mittels DNA-Sequenzierung des aberranten PCR-Fragmentes wurde eine G>A Transition an Position +9140 (Codon 507) nachgewiesen. Aufgrund dieser Substitution kommt es im betroffenen Codon zum Austausch der neutralen unpolaren Aminosäure Glycin (GGG) gegen die basische ungeladene Aminosäure Arginin (AGG).



**Abb. 9:** SSCP-Analyse bei Raumtemperatur

Der G>A Austausch in Position +9140 verändert keine Erkennungssequenz für ein Restriktionsenzym; zur Bestätigung der Mutation wurde deshalb das PCR-Fragment mehrmals in unabhängigen Proben sequenziert.

Die von uns erhobene Familienanamnese des Indexpatienten (70) ergab keine Informationen über weitere Familienmitglieder, die an einer hypertrophen Kardiomyopathie erkrankt waren oder sind.

Der Aminosäurerest G507 ist sowohl bei Mensch, Maus, Huhn und Oxolotl, als auch beim menschlichen fast und slow-type MYBPC konserviert (Siehe Abb. 10).

menschliches kardiales MYBP-C	EETFK-YRFKKD <b>G</b> -QRHHLIINE	516
Maus kardiales MYBP-C	EETFK-YRFKKD <b>G</b> -RKHHLIINE	512
Huhn kardiales MYBP-C	EETFK-YRFKKD <b>G</b> -KKQYLIINE	515
Oxolotl kardiales MYBP-C	EETFN-YRFKKD <b>G</b> WQETYLLINE	334
menschliches MYBPC fast-type	DSFKARYRFKKD <b>G</b> -KRHILIFSD	410
menschliches MYBPC slow-type	GP-KSRYRIRVE <b>G</b> -KKHILIIIEG	404

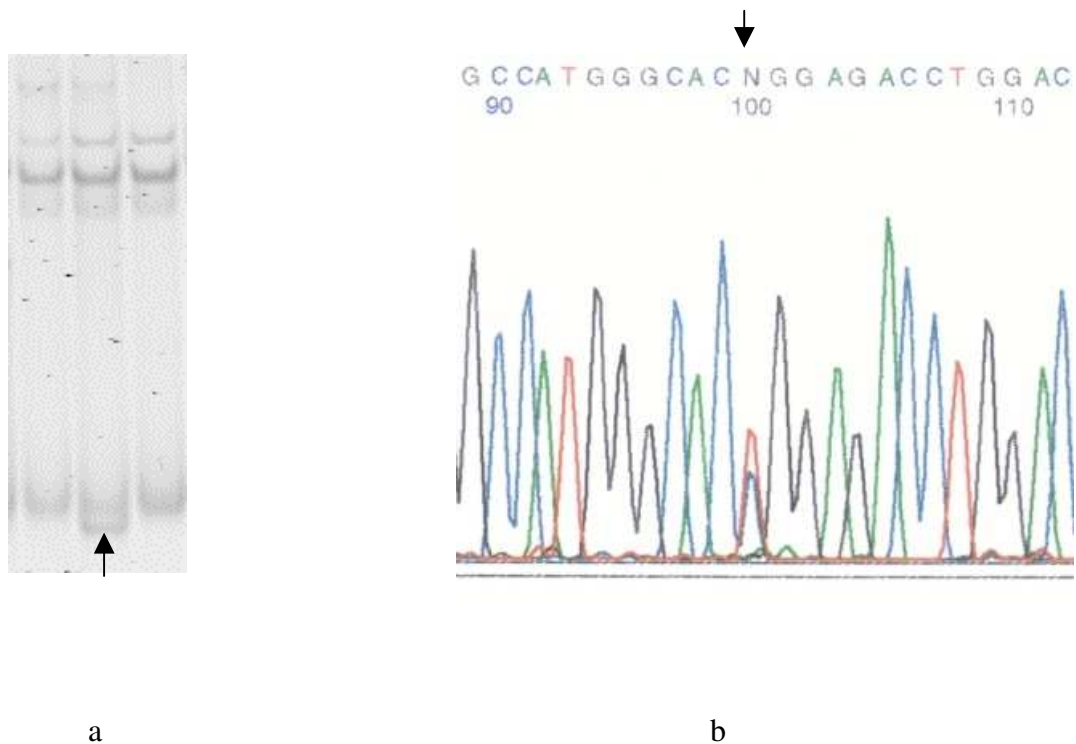
**Abb. 10:** Homologievergleich zwischen der Proteinsequenz von Mensch, Maus, Huhn und Oxolotl. Der Aminosäurerest G507 ist in allen vier Spezies und im humanen fast- und slow-type MYBPC-Protein konserviert.

**Tab. 6:** Klinische Merkmale des Indexpatienten 70 (**G507R**).

DNA-Nr.	70
Geschlecht	M
Alter bei Studieneinschluß	52
Alter bei Erkrankungsbeginn	30
Symptome	Palpitationen/ Dyspnoe
TASH, Myektomie	nein
ICD	Ja, im 47. Lebensjahr
IVS (mm)	30
IVS /PW	2.0
LVEDD (mm)	44
FS %	33
SAM	Nein
Gradient (mmHg)	43
LVEF (%)	53
LVEDVI (mL <sup>2</sup> )	95
LVEDP (mmHg)	17

### 3.1.4 Gly523Trp (G523W)

Ebenfalls in Exon 17 wurde bei der SSCP-Analyse bei dem Indexpatienten 1147 ein auffälliges Laufverhalten beobachtet (Abb. 11a). Anschließend sequenzierten wir das entsprechende DNA-Fragment. Bei der gefundenen Variante handelt es sich um eine G>T Transversion an Position +9188 (Codon 523). Durch diesen G>T-Austausch im betroffenen Codon wird das neutrale unpolare Glycin gegen das neutrale polare Tryptophan (Abb. 11b) ausgetauscht. Wir schlossen einen Restriktionsverdau mit *BsrI* an. Nach der gelelektrophoretischen Auftrennung der erhaltenen Fragmente wurde bei Trägern des Wildtyp-Allels nur eine Bande von 290 Bp identifiziert. Bei dem Träger des mutierten Allels wurde zusätzlich eine Bande von 148 Bp beobachtet.



**Abb. 11:** a) SSCP Analyse bei 4 °C und b) DNA- Sequenzierung von Exon 17, Lab.-Nr.1147

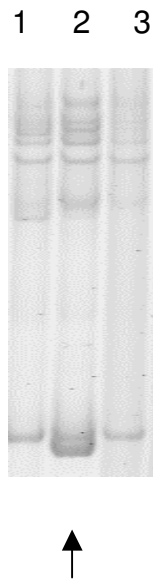
Bei dem Indexpatienten 1147 zeigte sich bereits im dritten Lebensjahrzehnt eine erhebliche Septumhypertrophie, die zur Obstruktion des linksventrikulären Ausflußtraktes führte (Vollbild der HOCM). Die Familienanamnese ergab, daß der Vater des Indexpatienten 1147 im Alter von 43 Jahren an einem Herzfehler verstorben sei. Genaue Befunde hierzu lagen uns leider nicht vor, so daß ein Plötzlicher Herztod des Vaters auf dem Boden einer HOCM möglich erscheint.

**Tab. 7:** Klinische Merkmale des Indexpatienten 1147 mit der Variante **G523W**.

DNA-Nr.	1147
Geschlecht	M
Alter bei Studieneinschluß	31
Alter bei Erkrankungsbeginn	< 30
Symptome	Palpitationen
TASH, Myektomie	Nein
ICD	Ja
IVS (mm)	21
IVS /PW	1.3
LVEDD (mm)	nda
FS %	42.71
SAM	Ja
Gradient (mmHg)	37
LVEF(%)	nda
LVEDVI (mL <sup>2</sup> )	nda
LVEDP (mm Hg)	nda

### 3.1.5 Cys566Arg (C566R)

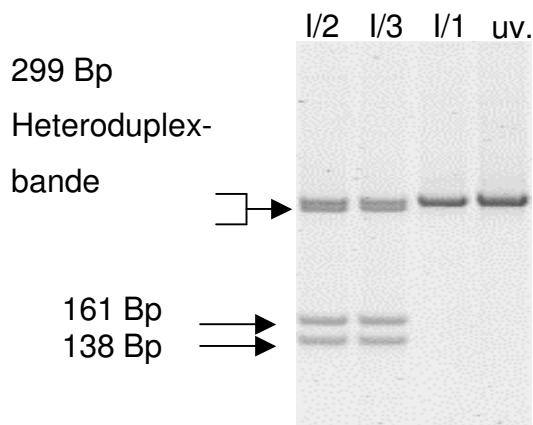
Bei der SSCP-Analyse von Exon 18 konnte bei 4°C eine Laufmusterabweichung bei dem Indexpatienten 1423 identifiziert werden (Abb. 12). Mittels DNA-Sequenzierung des aberranten PCR-Produktes wurde eine T>C Transition an Position +9738 (Codon 566) nachgewiesen. Aufgrund dieser Substitution kommt es im Protein zum Austausch der neutralen polaren Aminosäure Cystein (TGT) gegen die basische ungeladene Aminosäure Arginin (CGT).



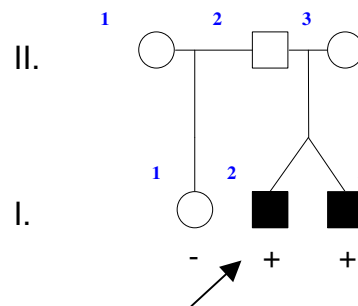
**Abb.12:** SSCP-Analyse bei 4°C.

Der T>C Austausch in Codon 566 fällt durch die Ausbildung einer Heteroduplexbande auf (Abb.13a). Aufgrund des Basenaustausches entsteht im mutierten Allel eine Erkennungssequenz für das Restriktionsenzym *TaiI*. Nach PCR-Amplifikation (Primer MYBPC-Ex18F/R) und Restriktionsverdau mit *TaiI* lassen sich zwei Fragmente von 161 und 138 Basenpaaren voneinander trennen.

Zur weiteren Genotypisierung standen der ebenfalls betroffene eineiige Zwillingbruder (I/3) und die gesunde Halbschwester (I/1) des Indexpatienten zur Verfügung; die Mutation konnte nur bei dem Zwillingbruder identifiziert werden (Abb. 13b).



a



b

**Abb. 13:** a) Restriktionsverdau mit *TaiI* zum Nachweis der C566R-Mutation. Die Probanden I/2 und I/3 sind Mutationsträger, die Probandin I/1 ist homozygot für das Wildtyp-Allel C566. Deutlich sichtbar ist die Heteroduplexbande, die sich durch die T>C Substitution ausbildet. uv: unverdautes PCR-Produkt

b) Stammbaum der Familie des Indexpatienten 1423 (II/1). Kreis: weiblich; Quadrat: männlich; ausgefülltes Symbol: HCM-Phänotyp; viertel-gefülltes Symbol: einzelne Symptome einer HCM

(kein vollausgebildetes Krankheitsbild); +: Mutationsträger; -: genotypisiert, aber kein Mutationsträger; Pfeil: Indexpatient.

Der Aminosäurerest C566 ist sowohl bei Mensch, Maus, Huhn und Oxolotl als auch beim menschlichen fast- und slow-type MYBPC-Protein konserviert (siehe Abb. 14).

humanes kardiales MYBP-C	DLMVGAKDQAVFK <b>C</b> EVSDENVRG	575
kardiales Maus MYBP-C	DLAVGAKDQAVFK <b>C</b> EVSDENVRG	571
kardiales Huhn MYBP-C	DLTVKARDQAVFK <b>C</b> EVSDENVKG	574
kardiales Oxolotl MYBP-C	DLTVMARDQAVFK <b>C</b> EVSDENVKG	394
humanes fast-type MYBPC	DLTVKASEQAVFK <b>C</b> EVSDEKVTG	469
humanes slow-type MYBPC	DQTVNLGKEICLK <b>C</b> EIS-ENIPG	462

**Abb. 14:** Homologievergleich zwischen der Proteinsequenz von Mensch, Maus, Huhn und Oxolotl. Der Aminosäurerest C566 ist in allen vier Spezies und im humanen fast- und slow-type MYBPC-Protein konserviert.

**Tab. 8:** Klinische Merkmale des Indexpatienten 1423 mit der Variante **C566R** und seines Zwillingsbruders.

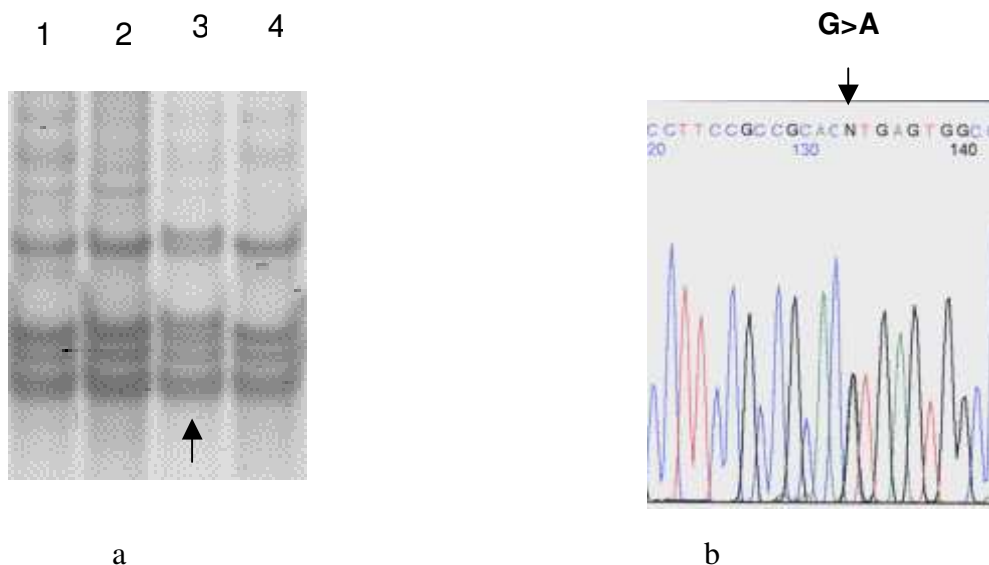
DNA-Nr.	1423	1893
Geschlecht	M	M
Alter bei Studieneinschluß	56	56
Alter bei Erkrankungsbeginn	53	44
Symptome	AP	AP
ICD, TASH, Myektomie	Nein	Nein
IVS (mm)	22	22
IVS /PW	1.8	2.2
LVEDD (mm)	44	48
FS %	34	33
SAM	Nein	Nein
Gradient (mmHg)	Nein	Nein
LVEF (%)	nda	62
LVEDVI ( mL <sup>2</sup> )	nda	88
LVEDP ( mm Hg )	nda	13

## 3.2 Spleißmutationen

Neben den drei Aminosäuresubstitutionen, die wir im MYBP-C Gen identifiziert haben, wurden auch zwei Spleissmutationen (IVS7+1G>A und IVS20-2A>G) gefunden. Beide Spleissmutationen führen zu Leserasterverschiebungen und zu einem verfrühten Proteinabbruch.

### 3.2.1 IVS7 +1G/A

Bei der SSCP-Analyse bei Raumtemperatur wurden in Exon 7 bei zwei Patienten (1331 und 169) identisch aussehende Laufmusterunterschiede entdeckt (Abb. 15a, gezeigt ist nur Patient 1331 in Spur 3). Die DNA-Sequenzierung ergab eine G>A Transition an Position 4861 (Abb. 15b).

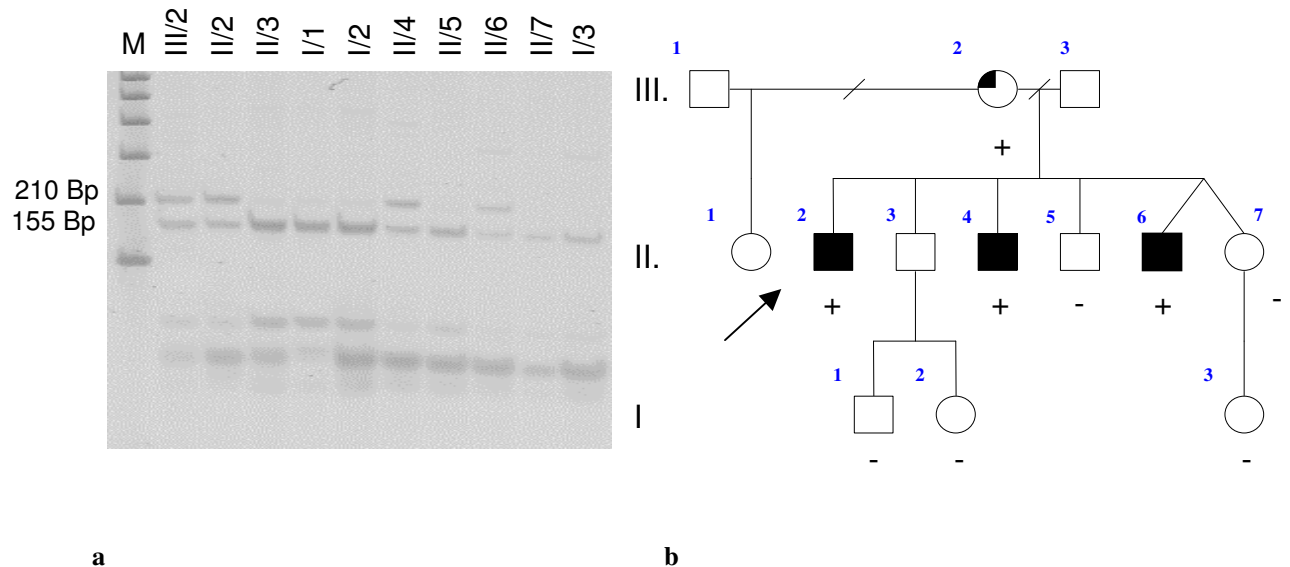


**Abb. 15:** a) SSCP-Analyse bei RT und b) DNA-Sequenzierung

Da die G>A Transition eine Erkennungssequenz für das Restriktionsenzym *TaiI* zerstört, konnte ein Restriktionsverdau zur Bestätigung und zum schnellen Nachweis der Mutation



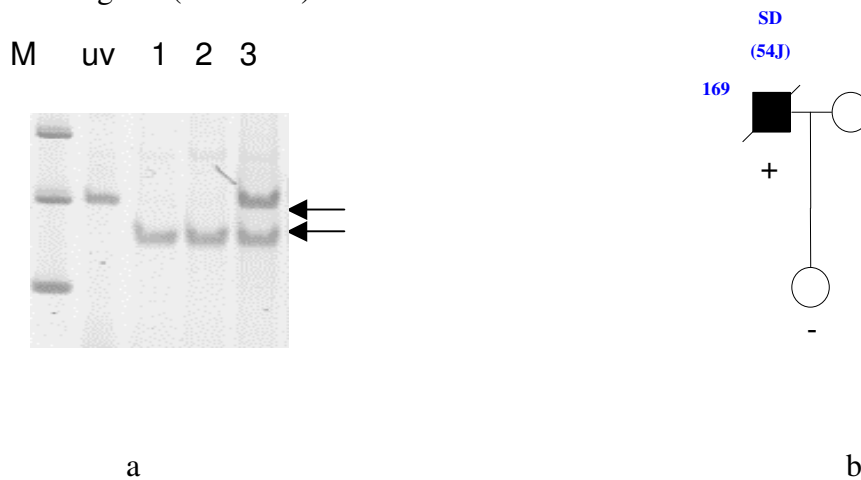
eingesetzt werden. Nach Amplifikation mit den Primern MYBPC-Ex7F/R und anschließendem Verdau mit *Tai*I entstand bei dem Wildtyp-Allel (G-Allel) ein 155 Bp langes Fragment, bei heterozygoten Mutationsträgern zeigt sich eine unverdaute, 210 Bp lange Bande (Abb. 16a). Die Ergebnisse der Familienuntersuchung sind in Abb. 16b zusammengefasst.



**Abb. 16: a)** RFLP zum Nachweis der IVS7+1G>A Mutation mittels Restriktionsverdau mit *Tai*I. Die Probanden III/2, II/2, II/4 und II/6 sind Mutationsträger, die Probanden II/3, I/1, I/2, II/5, II/7 und I/3 sind homozygot für das Wildtyp-Allel. M: 100-Bp DNA-Marker.

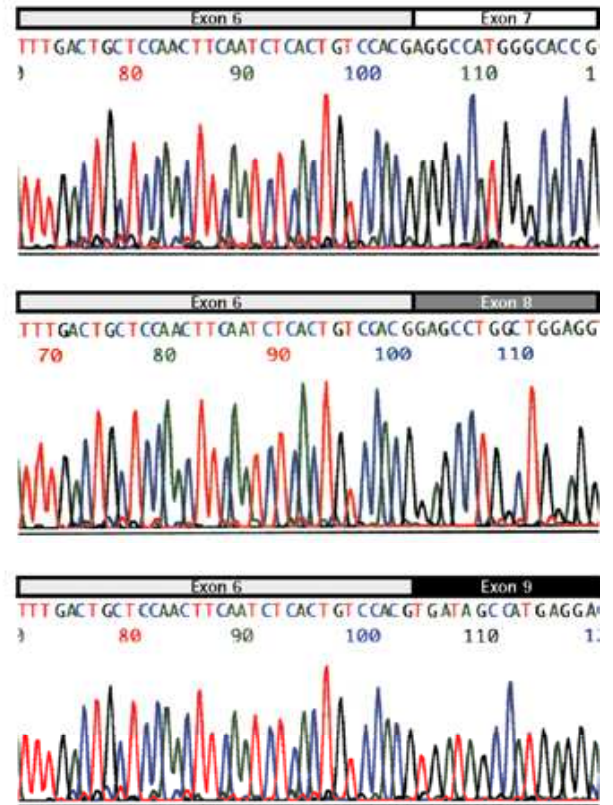
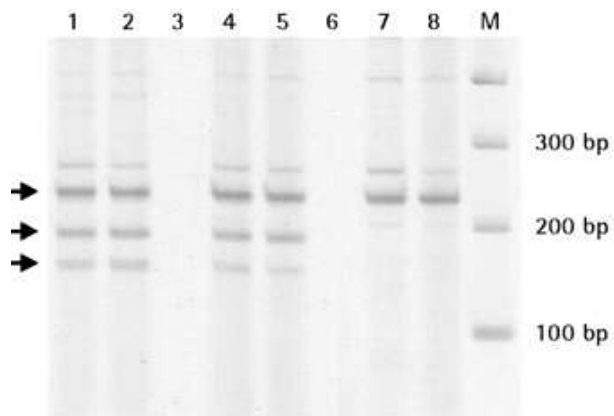
**b)** Stammbaum der Familie des Indexpatienten 1331 (II/1). Kreis: weiblich; Quadrat: männlich; ausgefülltes Symbol: HCM-Phänotyp; viertel-gefülltes Symbol: einzelne Symptome einer HCM (kein vollausgebildetes Krankheitsbild); +: Mutationsträger; -: genotypisiert, aber kein Mutationsträger; III.: ( 2: Mutter des Indexpatienten, DNA-Nr 1975), II.: ( 2: Indexpatient DNA-Nr.1331( Pfeil), 4 und 6: Brüder des Indexpatienten, DNA-Nr. 1978,1992).

Die Mutation IVS7+1G>A konnte bei Patient 169 mittels Restriktionsverdau bestätigt werden (Abb. 17a); die ebenfalls untersuchte gesunde Tochter des Patienten 169 ist keine Mutationsträgerin (Abb. 17b).



**Abb. 17:** a) RFLP-Analyse zum Nachweis der IVS7+1G>A Mutation bei Patient 169 mittels der Restriktionsverdau mit *TaiI* und b) Stammbaum des Patienten.

Funktionell betrachtet wird durch die IVS7+1G>A Mutation die Spleiss-Donorstelle im Intron 7 zerstört. In der durchgeführten RT-PCR-Analyse gelang der Nachweis zweier aberranter Transkripte. Die anschließende DNA-Sequenzierung der subklonierten RT-PCR-Fragmente zeigte, dass im Transkript 2 das Exon 7 fehlt ( $\Delta\text{ex}7$ ) und im Transkript 3 Exon 7 und 8 fehlen ( $\Delta\text{ex}7/8$ ).



**Abb. 18 a)** RT-PCR-Analyse und **b)** DNA-Sequenzierung der aberranten Transkripte.



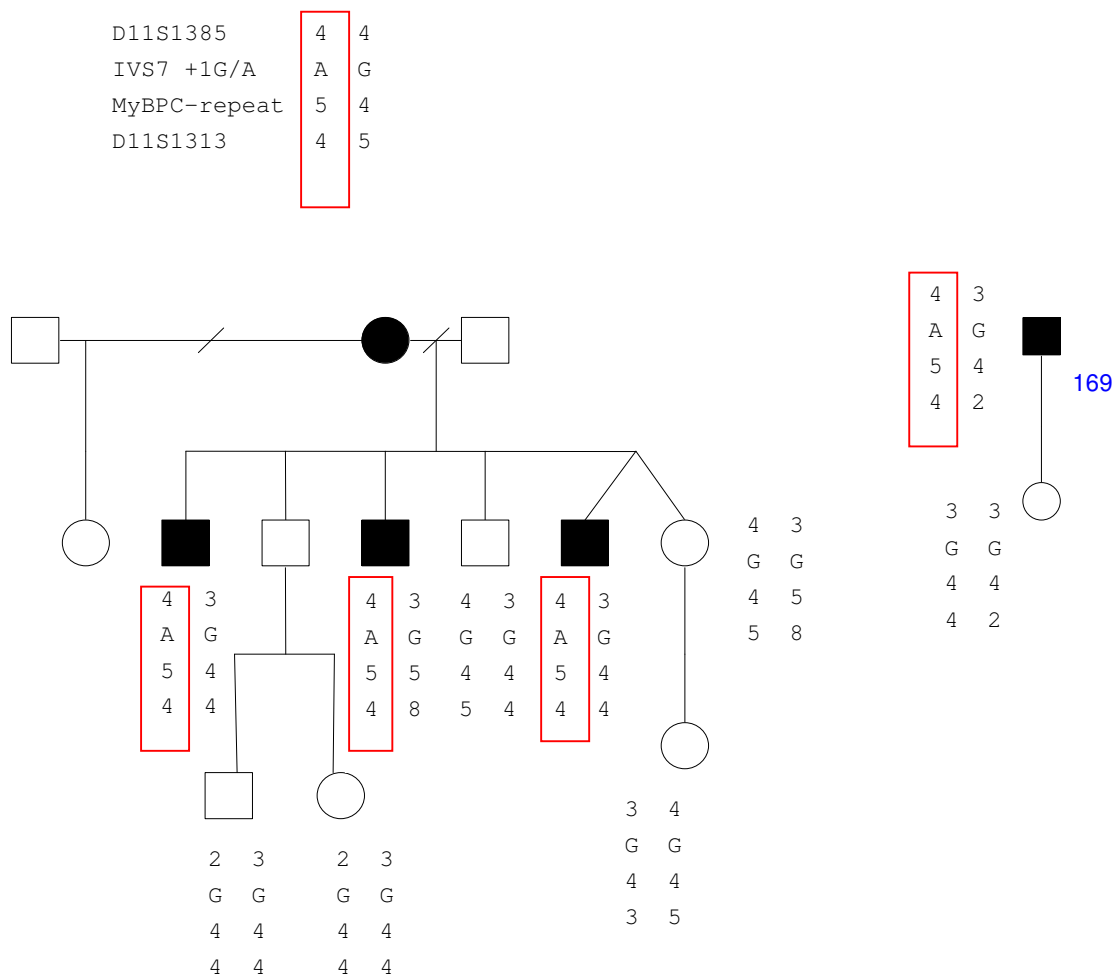
Variante **IVS7 +1G/A**.

DNA	1331 Indexpat.	1975 Mutter d. Indexpat. 1331	1978 Bruder d. Indexpat. 1331	1992 Bruder d. Indexpat. 1331	169 Indexpat.
Geschlecht	M	F	M	M	M
Alter bei Studieneinschluß	40	62	36	31	*
Alter bei Erkrankungsbeginn	38	59	27	26	24
Symptome	AP, Dyspnoe	AP, Dyspnoe	AP, Dyspnoe, Präsynkope	AP, Dyspnoe	AP, Dyspnoe
TASH	1998	Nein	Nein	1999	Nein
Myektomie	Nein	Nein	1994	Nein	Nein
ICD	Ja	Nein	Ja	Nein	Nein
IVS (mm)	23	18	19	24	20
IVS /PW	1.9	1.6	1.5	1.7	1.7
LVEDD (mm)	50	40	42	43	49
FS %	46	43	45	30	40
SAM	Ja	Nein	Ja	Ja	Nein
Gradient (mmHg)	47	Nein	85	60	10
LVEF (%)	70	nda	81	76	43
LVEDVI (mL <sup>2</sup> )	nda	nda	91	92	97
LVEDP (mmHg)	nda	nda	17	41	16

nda = keine Daten verfügbar ;\* Sustained VT $\geq$ 30

### 3.2.2 IVS7+1G>A ist eine Founder-Mutation

Die Mutation IVS7+1G>A wurde bei zwei nicht miteinander verwandten Patienten deutscher Abstammung identifiziert. Um abzuklären ob es sich bei dieser Mutation um zwei unabhängige Mutationsereignisse gehandelt hat oder ob die mutations-tragenden Chromosomen einen gemeinsamen Ursprung haben, führten wir in den betreffenden Familien eine Haplotyp-Analyse durch ( siehe Methodik 2.7) .

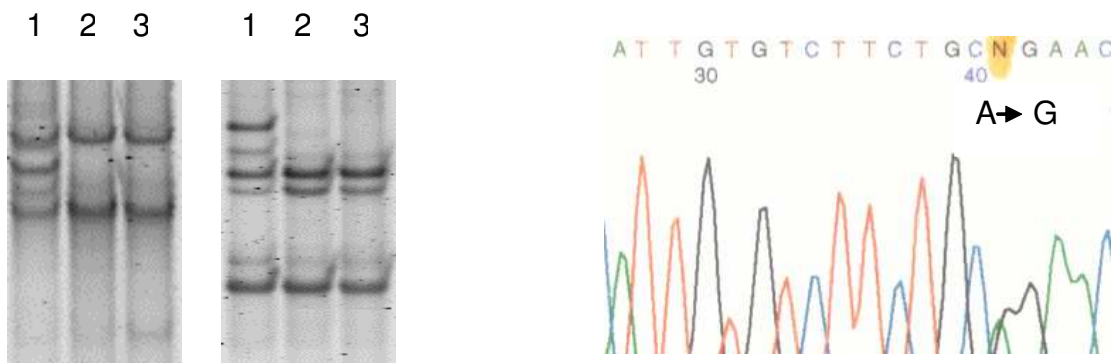


**Abb. 20:** Stammbäume der Familien

Die durchgeführte Haplotyp-Analyse zeigt, dass die Mutation bei beiden Patienten sehr wahrscheinlich einen gemeinsamen Ursprung hat, denn beide Patienten besitzen identische Haplotypen.

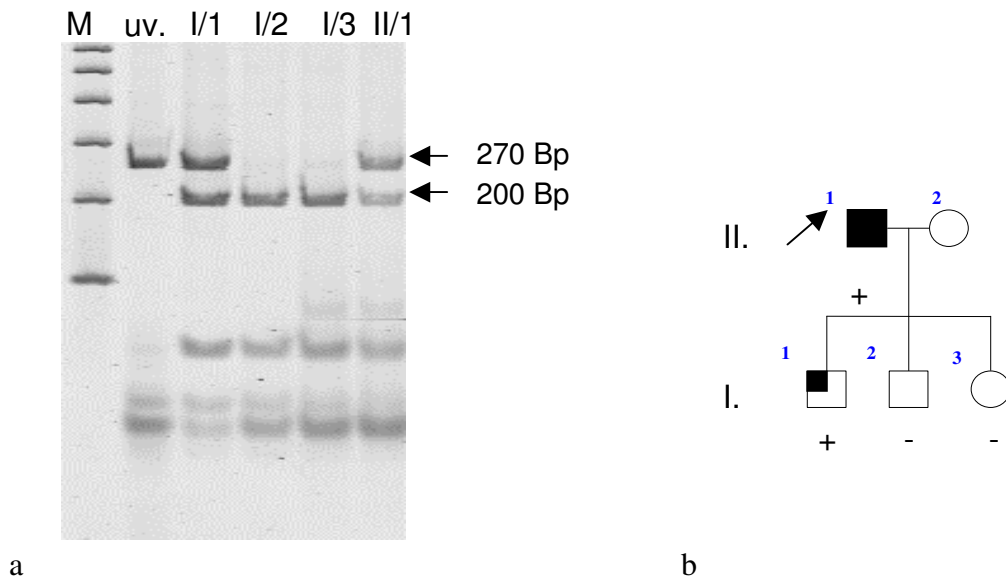
### 3.2.3 IVS20–2A/G

Durch ein auffälliges SSCP-Muster, sowohl bei Raumtemperatur als auch bei 4°C, wurde bei Indexpatient 14 eine zweite Spleiss-Mutation identifiziert (Abb. 21a, b). Die DNA-Sequenzierung ergab eine A>G Transition an Position –2 von Intron 20 (Abb. 21 c).



**Abb. 21:** SSCP-Analyse bei **a)** RT und **b)** 4°C und **c)** DNA-Sequenzanalyse.

Durch den A>G-Austausch wird eine Schnittstelle für das Restriktionsenzym *PstI* zerstört. Nach Amplifikation (Primer MYBPC-Exon21F/R) und Verdau mit *PstI* entsteht beim Wildtyp-Allel nur eine Bande von 200 Bp Länge. Bei Vorliegen des mutierten Allels zeigt sich zusätzlich eine unverdaute Bande von 270 Bp Länge (Abb. 22a).

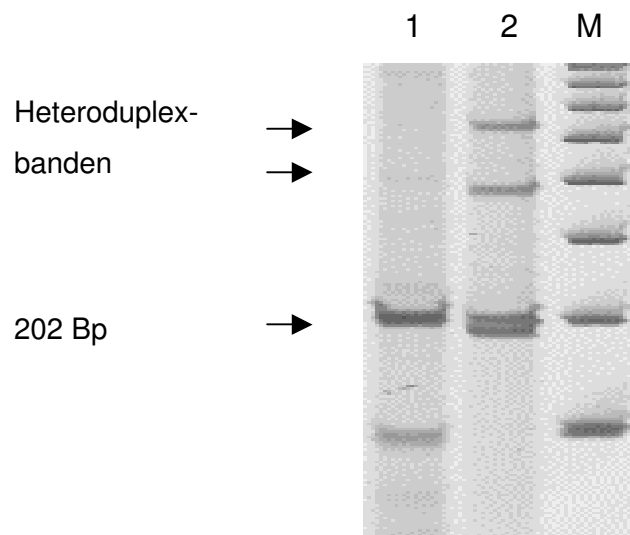


**Abb. 22:** a) RFLP-Analyse zum Nachweis der IVS20–2A/G Mutation mittels Restriktionsverdau mit *PstI* und b) Stammbaum der Familie des Indexpatienten 14, mit Pfeil markiert. ( II. 1: Indexpatient 14), (I. 1, 2, 3 : Kinder des Indexpatienten 14, 1= DNA 1913)

DNA aller drei Kinder des Indexpatienten 14 wurde mit dem etablierten Restriktionsverdau untersucht (Abb. 22a). Es konnte gezeigt werden, daß der älteste Sohn Mutationsträger ist. Klinisch weist er leichte Symptome einer HCM auf.

Durch den Austausch von A>G (Pfeil) an Position –2 von Intron 20 (Spleiss-Akzeptorstelle) wird diese Spleiss-Stelle zerstört und es wird stattdessen eine kryptische Spleiss-Akzeptorstelle in Exon 21 (\*\*) benutzt. Diese Variante verursacht durch Verlust von 11 Bp eine Verschiebung des Leserasters, und es entsteht ein Stopcodon mit vorzeitigem Protein-Abbruch in Codon 661 (Erdmann et al.2001). Dadurch kommt es in dem Protein zum Verlust von 612 Aminosäuren, und Titin– Myosinbindungsstellen gehen verloren (Abb. 23).





**Abb. 23:** RT-PCR-Analyse

**Wildtyp**

Intron 20

Gln G  
GG CAG G gt.....ca..1kb.....tgca↓ Lu Pro Pro Lys Ile His Leu  
AA CCT CCC AAG ATC CAC CTG  
\*\*

**Mutante**

Gln A  
GG CAG G gt.....ca..1kb.....tgcgAACCTCCCAAG AT CCA CCT GGA CTG  
1 \*\* 661  
Pro Arg Pro His Thr Arg His His Cys Gly Cys Ser Trp Lys Ter  
CCC AGG CCG CAT ACC AGA CAC CAT TGT GGT TGT AGC TGG AAA TAA

**Abb. 24:** Sequenzvergleich zwischen Wildtyp und Mutante. Durch den Austausch von A>G (Pfeil) an Position -2 von Intron 20 (Spleiss-Akzeptorstelle) wird diese Spleiss-Stelle zerstört und eine kryptische Spleiss-Akzeptorstelle in Exon 21 (\*\*) wird benutzt. Dadurch kommt es auf mRNA-Ebene zum Verlust von 11 Bp mit Verschiebung des Leserasters mit vorzeitigem Protein-Abbruch in Codon 661.

**Tab. 10:** Klinische Merkmale der Indexpatienten 14 und 1913 (Sohn des Indexpatient 14) mit der Variante **IVS20-2A>G**.

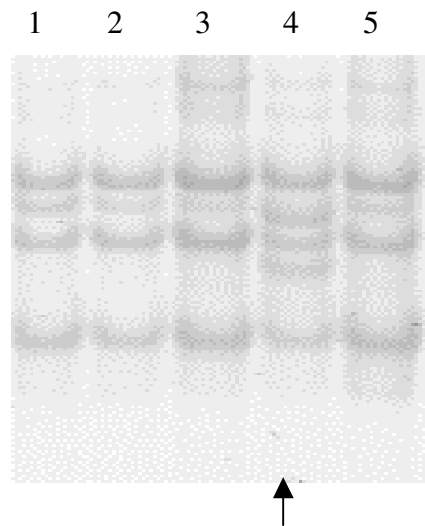
DNA-Nr.	14	1913
Geschlecht	M	M
Alter bei Studieneinschluß	47	27
Alter bei Erkrankungsbeginn	43	18
Symptome	Palpitation, Dyspnoe	Schwindel
TASH	Nein	Nein
Myektomie	Nein	Nein
ICD	ICD	Nein
IVS (mm)	18	13
IVS / PW	1.3	1.1
LVEDD (mm)	45	46
FS %	32	41
SAM	Nein	Nein
Gradient (mmHg)	Nein	Nein
LVEF (%)	76	nda
LVEDVI (mL <sup>2</sup> )	64	nda
LVEDP (mmHg)	16	nda

### 3.3 Deletionen

Neben den oben beschriebenen Aminosäuresubstitutionen und Spleiss-Mutationen identifizierten wir auch zwei Deletionen von jeweils einem Cytidin-Nukleotid in Exon 12 und 13 (delC343 und delC390).

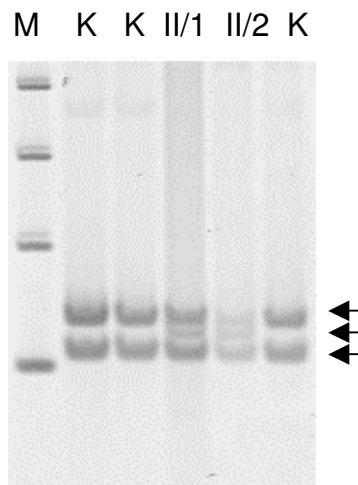
#### 3.3.1 DelC343

In der SSCP-Analyse von Exon 12 bei Raumtemperatur konnte ein aberrantes Laufmuster bei der Patientin 1670 identifiziert werden (Abb. 25). Die DNA-Sequenzierung des betroffenen PCR-Fragments ergab eine Deletion eines C-Nukleotids in Position +6447 (Codon 343).

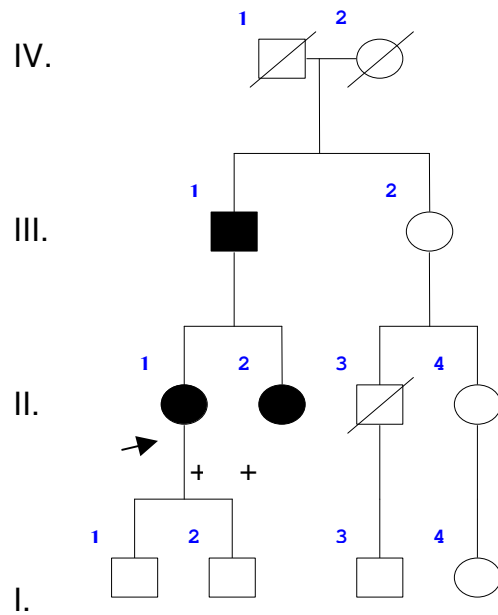


**Abb. 25:** SSCP-Analyse von DNA 1670 bei RT

Durch die Deletion entsteht eine zusätzliche Schnittstelle für das Restriktionsenzym *NlaIII*. Mittels Restriktionsverdau mit *NlaIII* und anschließender gelelektrophoretischer Auftrennung konnte die Mutation sowohl bei Patientin 1670, als auch bei der Schwester der Patientin nachgewiesen werden (Abb. 26).



**Abb. 26:** *NlaIII*-Verdau zum Nachweis der DelC343 Mutation



**Abb. 27:** Stammbaum der Patientin 1670 ( mit Pfeil markiert), III. 1: Vater von der Indexpatientin 1670, II. 2: Schwester der Indexpatientin)

Aufgrund der 1-Bp-Deletion kommt es zu einer Verschiebung des Leserasters in Exon 12 und zum Einbau von sechs aberranten Aminosäuren, bis aus Codon 349 ein verfrühtes Stopcodon entsteht (Abb. 28).

Eine hypertrophe obstruktive Kardiomyopathie wurde bei der Patientin bereits im 30. Lebensjahr diagnostiziert. Dieselbe genetische Variante wie bei der Indexpatientin konnte bei dem klinisch betroffenen Vater und der Schwester der Patientin nachgewiesen werden. Die Schwester leidet ebenfalls seit ihrem 30. Lebensjahr an einer hypertrophen Kardiomyopathie, allerdings ohne bedeutsame Obstruktion im linksventrikulären Ausflußtrakt. Die ein- und fünfjährigen Söhne der Patientin waren nicht Träger dieser Variante, der ältere Sohn zeigte bei einer kardiologischen Untersuchung keine Auffälligkeiten. Befunde von kardiologischen Untersuchungen der genotypisierten Mutationsträger standen uns leider nicht zur Verfügung.

## Wildtyp

343  
 Val Thr Asp Leu Arg Gly Met Leu  
 GTC ACT GAC CTG CGC GGC ATG CTA ....

## Mutante

349  
 Val Met Thr Cys Ala Ala Cys Ter  
 GTC ATG ACC TGC GCG GCA TGC TAA

**Abb. 28:** Sequenzvergleich zwischen dem Wildtyp-Allel und dem mutierten Allel. Aufgrund der Deletion des C-Nukleotids in Codon 343 kommt es zu einer Verschiebung des Leserasters, zum Einbau von 6 aberranten Aminosäuren und einem vorzeitigen Proteinabbruch in Codon 349.

**Tab. 11:** Klinische Merkmale von Indexpatientin 1670 (**DelC343**) und ihrer Schwester (1679)

DNA-Nr.	1670	1679
Geschlecht	W	W
Alter bei Studieneinschluß	30	30
Alter bei Erkrankungsbeginn	29	30
Symptome	Dyspnoe, verminderte Belastbarkeit	Dyspnoe, verminderte Belastbarkeit, Synkope
TASH, Myektomie	Nein	Nein
ICD	Nein	Nein
IVS (mm)	nda	15
IVS / PW	nda	nda
LVEDD (mm)	nda	41

### 3.3.2 DelC390

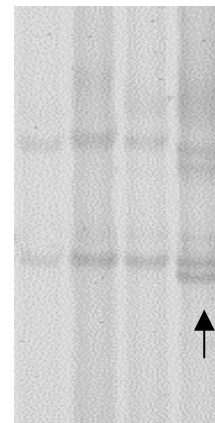
In der SSCP-Analyse von Exon 13 bei Raumtemperatur wurde bei Patient 164 ein auffälliges Bandenlaufmuster gefunden (Abb. 29). Die DNA-Sequenzierung zeigte eine 1-Bp Deletion in Position +8276 (Codon 390).

Die Deletion in Exon 13 führt zu einer Leserasterverschiebung, durch die es zum Einbau von 15 aberranten Aminosäuren kommt, bevor dann aus Codon 405 ein frühzeitiges Stopcodon entsteht. Dadurch kommt es zum Verlust von 896 Aminosäuren sowie der Titin- und Myosinbindungsstellen (Abb. 30).

Eine hypertrophe obstruktive Kardiomyopathie wurde bei dem Patienten im Alter von 39 festgestellt. Im Alter von 41 Jahren wurde bei ihm eine Myektomie durchgeführt. Vor der Myektomie betrug die Dicke des interventrikulären Septums 26 mm. Postoperativ war im linksventrikulären Ausflußtrakt keine Obstruktion mehr nachweisbar, aber es kam zum erneuten Auftreten der Septumhypertrophie (ohne nachweisbaren Druckgradienten). Eine Untersuchung von Angehörigen war uns leider nicht möglich, die Familienanamnese ergab jedoch, dass die Mutter des Indexpatienten im jungen Alter gestorben sei.

**Abb. 29:** SSCP-Analyse von Exon 13 bei RT.

WT WT WT 164



### Wildtyp

					390					
		Glu	Leu	Ala	Asp	His	Asp	Ala	Glu	
TG		GAA	CTG	GCT	GAC	CAT	GAC	GCT	GAG	.....
						↑				

del C

### Mutante

		Glu	Leu	Ala	Asp	Met	Thr	Leu	Arg	Ser	Asn	
TG		GAA	CTG	GCT	GAC	ATG	ACG	CTG	AGG	TCA	AAT	
												405
	Gly	Ser	Arg	Met	Ala	Arg	Arg	Ser	Arg		Ter	
GGC	TCA	AGA	ATG	GCC	AGG	AGA	TCC	AGA	TGA			

**Abb. 30:** Sequenzvergleich zwischen dem Wildtyp-Allel und dem mutierten Allel. Aufgrund der Deletion des C-Nukleotids in Codon 390 kommt es zu einer Verschiebung des Leserasters und dadurch zum Einbau von 15 aberranten Aminosäuren und einem vorzeitigen Proteinabbruch in Codon 405.

Eine Familienuntersuchung des Indexpatienten 164 konnte nicht durchgeführt werden.

**Tab. 12:** Klinische Merkmale des Indexpatienten 164 (DeIC390).

DNA-Nr.	164
Geschlecht	M
Alter bei Studieneinschluß	51
Alter bei Erkrankungsbeginn	39
Symptome	rez. Synkopen, Belastungsangina und -dyspnoe, Palpitationen
TASH	Nein
ICD	Nein
Myektomie	41. Lebensjahr
IVS (mm)	19
IVS / PW	1.0
LVEDD (mm)	47
LVESD (mm)	31
FS %	35
SAM	Nein
Gradient (mmHg)	Nein

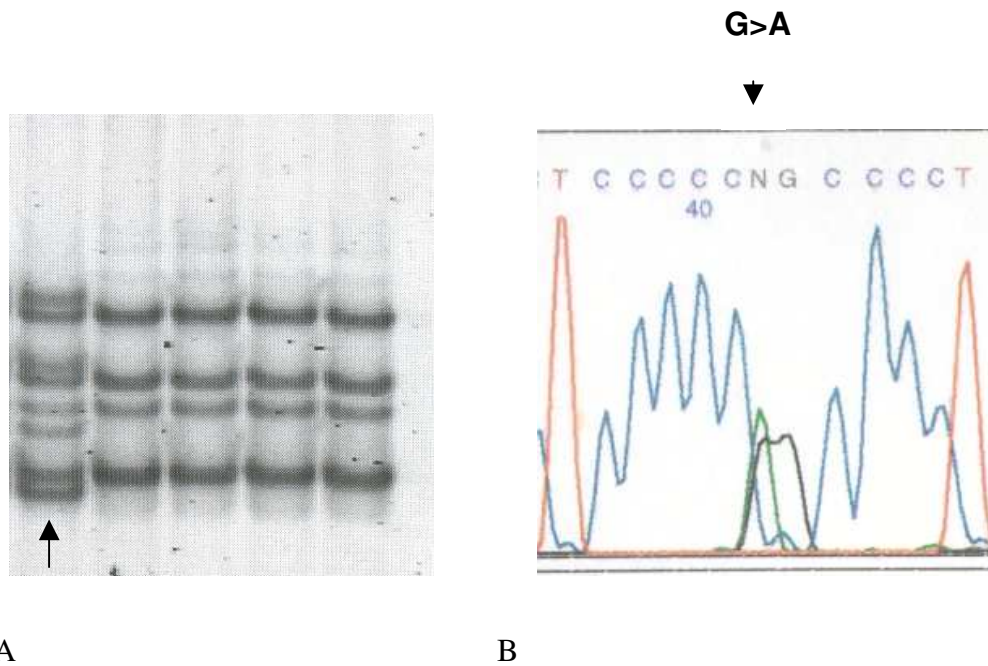
### **3.4 Zwei Varianten mit unbekannter Krankheitsrelevanz**

Die Varianten IVS9-36G>A und IVS17+11C>G befinden sich in Introns und beeinflussen vermutlich keine Spleiss-Stellen. Bei Variante IVS9-36G>A könnte es sich um eine krankheitsrelevante Mutation handeln (siehe Kapitel 3.4.1).

#### **3.4.1 IVS9-36G>A**

Die SSCP-Analyse von Exon 10 ergab bei dem Patienten Nr. 343 ein aberrantes Laufmuster (Abb. 31a). Die DNA-Sequenzierung ergab, dass an Position +5651 ein G>A Austausch vorliegt (Abb. 31b).

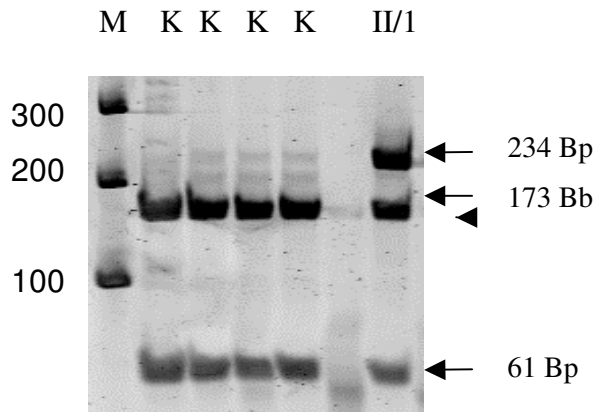




**Abb. 31:** a) SSCP-Analyse von Exon 10 des Pat. 343. Das aberrante Laufmuster des Pat. unterscheidet sich deutlich von den Kontrollen. b) DNA-Sequenzierung

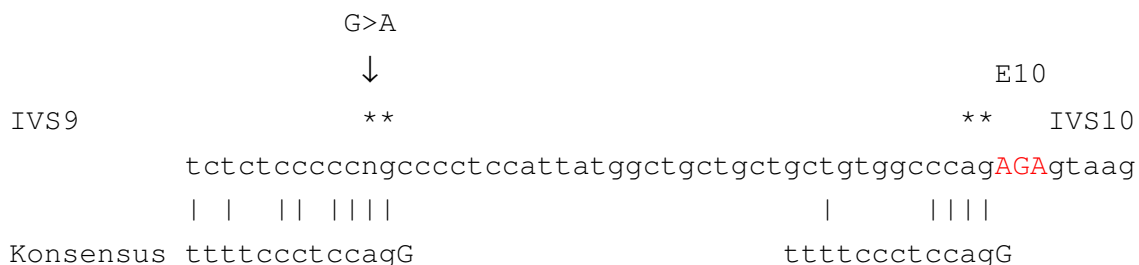
Durch die G>A Substitution wird eine Schnittstelle für das Restriktionsenzym *HpaII* zerstört. Nach Amplifikation (MYBPC-Exon10F/R Primer) und enzymatischer Spaltung mit *HpaII* entstehen bei homozygotem Vorliegen des Wildtyp-Allels zwei Banden von 173 Bp und 61 Bp Länge. Bei heterozygoten Mutationsträgern findet sich noch zusätzlich eine unverdaute Bande von 234 Bp Länge (Abb. 32).

Die Mutation IVS9-36G>A liegt nicht direkt in einer für das Spleissen notwendigen Konsensussequenz. Die Sequenzanalyse in der Umgebung der Mutation zeigt aber, dass die Mutation trotzdem krankheitsrelevant sein könnte, denn aufgrund der Mutation entsteht eine neue Spleiss-Akzeptorstelle (siehe Abb. 33), die zu einem aberranten Transkript führen könnte.



**Abb. 32:** Restriktionsverdau mittels der Restriktionsendonuklease *Hpa* II

Der „splice site score“ (<http://www2.imcb.osaka-u.ac.jp/splice/score.html>), ein Wert, der den Homologiegrad zwischen der Konsensussequenz für die Spleiss-Stellen und einer Vergleichssequenz ausdrückt, ergab für die neu entstandene Spleiss-Akzeptorstelle einen deutlich höheren Wert (10,7) als für die im Normalfall verwendete Spleissakzeptorstelle von Exon 10 (2,3).



**Abb. 33:** Sequenzvergleich zwischen der Konsensussequenz für Spleissakzeptorstellen und der neu entstandenen Spleissakzeptorstelle an Position –36 in IVS9 und der im „Normalfall“ verwendeten Spleissakzeptorstelle von Exon 10. Die Position der Mutation ist mit einem Pfeil gekennzeichnet. Die potentielle neue und die funktionelle Spleissakzeptorstelle sind mit \* gekennzeichnet. IVS9: Intron 9; E10: Exon 10; IVS10: Intron 10

### 3.4.1.1 Nachweis der funktionellen Relevanz von IVS9-36G>A

Zum Nachweis der auf Grund der Mutation veränderten Spleiss-Stelle wurde eine RT-PCR-Analyse (Primerpaar 10 IF/R) durchgeführt. Im Falle des normalen Spleissens entsteht auf mRNA-Ebene ein Produkt von 485 Bp Länge. Auf Grund der Verwendung der neu

entstandenen Spleisstelle entsteht ein Fragment von 519 Bp. Beim Mutationsträger (Nr. 343) sind zwei Banden von 485Bp bzw. 519 Bp Länge nachweisbar.

**Tab. 13:** Klinische Merkmale des Indexpatienten 343 (**IVS9-36G>A**).

DNA	343
Geschlecht	M
Alter bei Erkrankungsbeginn	61 Jahre
Symptome	Dyspnoe, verminderte Belastbarkeit, Arrhythmie
TASH, Myektomie, ICD	Nein
IVS (mm)	23
IVS / PW	1.2
LVEDD (mm)	42
FS %	nda
SAM	Ja
Gradient (mmHg)	33
LVEF(%)	nda
LVEDVI (mL <sup>2</sup> )	nda
LVEDP (mm Hg)	nda

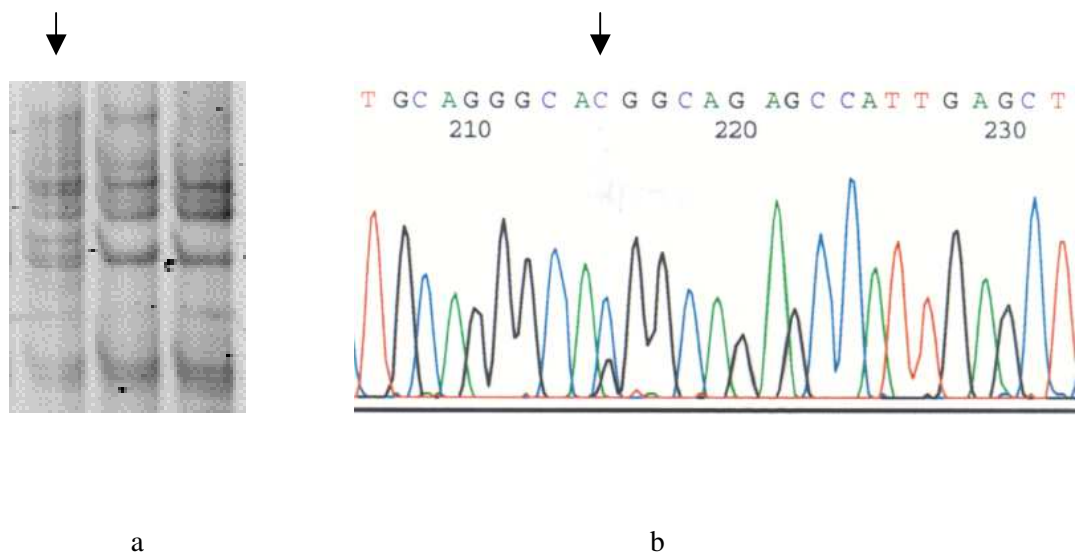
Bei dem Indexpatienten 343 wurde die HOCM im 61. Lebensjahr diagnostiziert. Im 71. Lebensjahr wurde wegen absoluter Arrhythmie bei Vorhofflimmern eine Cardioversion durchgeführt. Zudem hatte der Patient eine schwere linksventrikuläre Hypertrophie. Möglicherweise ist diese Variante für das Auftreten der HOCM mit spätem Beginn aber vollständiger Penetranz der Erkrankung verantwortlich. Eine Familienuntersuchung war leider nicht möglich.

### 3.4.2 IVS17+11C>G

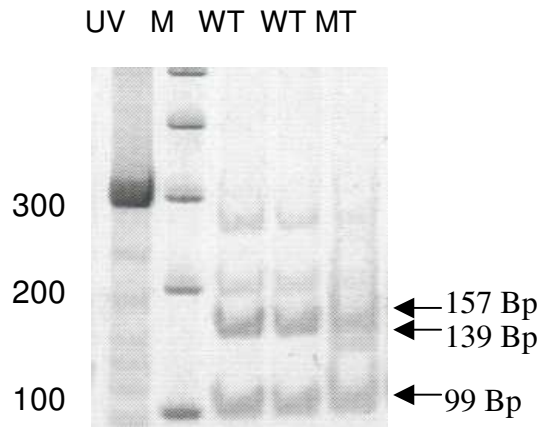
Bei der SSCP-Analyse des Exon 18 konnte eine Laufmusterabweichung bei 4°C bei dem Indexpatienten Nr. 1594 festgestellt werden (Abb. 34a). Die DNA-Sequenzierung des

aberranten PCR-Fragmentes ergab eine C>G Transversion an Position +9256 (Intron 17, siehe Abb. 34b).

Das mutierte Fragment enthält eine Schnittstelle für die Restriktionsendonuklease *SduI*, sodass eine RFLP-Analyse zum Nachweis dieser Variante möglich war (Abb. 35). Nach dem Auftrennen der Verdau-Produkte auf dem PAA-Gel zeigten sich beim Wildtyp zwei Banden von jeweils 157 Bp und 99 Bp Länge. Beim heterozygoten Mutationsträger konnte zusätzlich eine Bande von 139 Bp Länge festgestellt werden. Da diese Mutation im Intron vorkommt, keinen Einfluß auf eine Spleiss-Stelle hat und theoretisch nicht zum kodierenden Bereich des Genes gehört, ist der krankheitsverursachende Mechanismus dieser Mutation nicht bekannt. Sie wurde bei der Kontrollgruppe nicht gefunden.



**Abb. 34:** a) SSCP-Analyse Exon 18 (DNA 1594), bei 4°C, Pfeil=Variante,  
b) DNA – Sequenzierung.



**Abb. 35:** RFLP-Analyse mittels *Sdu* I zum Nachweis der Mutation IVS 17 +11 C>G ; UV= unverdautes PCR-Produkt, Fragmentlänge= 299 Bp; C-Allel = Wildtyp (WT) = 2 Banden (157 Bp,99 Bp); heterozygote Mutationsträger, C/G-Allel (MT) = (157 Bp,139 Bp,99 Bp), G-Allel (139 Bp, 99 Bp)

### 3.5 Polymorphismen

Neben den oben beschriebenen Mutationen haben wir im Rahmen der vorliegenden Dissertation insgesamt sieben, teilweise häufige Polymorphismen identifiziert (siehe Tab. 14). Die Genotypen von allen HCM-Patienten wurde für sämtliche Polymorphismen bestimmt (Tab. 22).

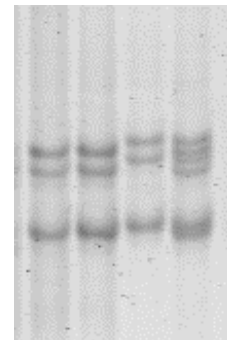
**Tab. 14:** Polymorphismen in MYBP-C (von Exon 6-21).

Häufigkeit	Exon/ IVS	Polymorphismus	Nukleotid Position	Nachweismethode
häufig	Exon 6	S236G	4229 A/G	Sequenz-Analyse
häufig	Exon 7	T262T	4825 C/T	RFLP mit <i>Hpa</i> II
selten	Exon 12	R326Q	6396 G/A	RFLP mit <i>Bfm</i> I
häufig	IVS 12	IVS12-24 C/T	8175 C/T	RFLP mit <i>Eae</i> I
häufig	IVS 13	IVS13+29 G/A	8360 G/A	RFLP mit <i>Ava</i> I
selten	IVS 19	IVS19+47 G/A	10732 G/A	Sequenz-Analyse
selten	IVS 21	IVS21+38 A/T	12209 A/T	Sequenz-Analyse

### 3.5.1 S236G

Es konnte durch SSCP-Analyse des Exons 6 diese Variante durch Laufmusterabweichung bei Raumtemperatur und 4°C identifiziert werden (Abb. 36).

11 11 22 12



**Abb. 36:** SSCP-Analyse des Polymorphismus

S236G in Exon 6 bei RT

11= Homozygot für WT

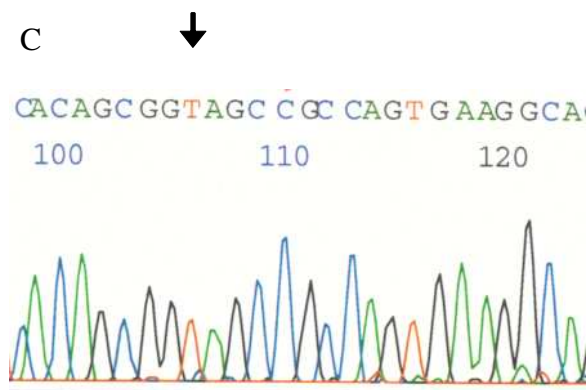
12= Heterozygot für die Variante S236G

22= Homozygot für die Variante S236G

Durch anschließende Sequenzierung konnte die Variante als eine A→G Transition in Nukleotidposition +4229 identifiziert werden. Im Protein wird dadurch das neutrale, mit polarer Seitenkette Serin durch das ebenfalls neutrale Glycin ausgetauscht, das eine polare Seitenkette hat (Abb. 37 a,b,c). Da diese Variante durch keine kommerziell erhältliche Restriktionsendonuklease nachweisbar ist, konnte zur Genotypisierung keine RFLP-Analyse etabliert werden. Deshalb wurde dieses Fragment nach PCR-Amplifikation (Primer F/R Exon 6 MYBP-C) sequenziert.



**Abb. 37: c)** Sequenz-Analyse (reverse).  
Dieser Pat. ist für die Variante S236G  
homozygot (Nr. 22)



		Genotypen			Allelfrequenz	
	HCM (n = 106)	AA	AG	GG	A-Allel	G-Allel
beobachtet		74	30	2	178 (0.84)	34 (0.16)
erwartet		74.80	28.50	2.71		
	Kontrollen (n = 84)					
beobachtet		66	17	1	149 (0.89)	19 (0.11)
erwartet		66.07	16.45	1.02		

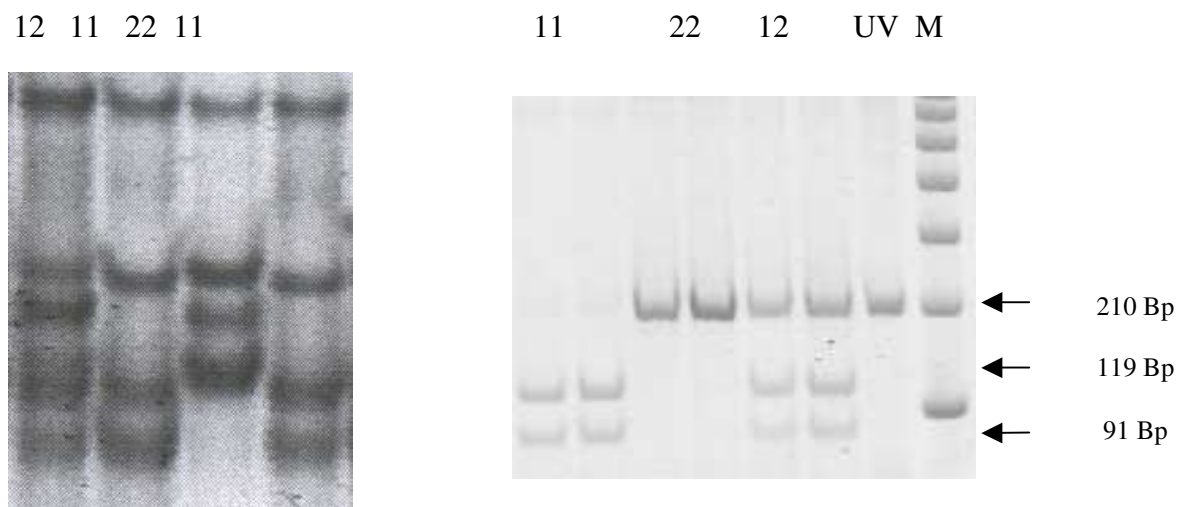
**Tab. 15:** Darstellung der beobachteten und erwarteten Genotypverteilungen und der Allelfrequenzen für die Variante S236G. Die Allelfrequenzen sind in Klammern angegeben.

Die Genotypverteilungen befinden sich im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht. Es besteht kein signifikanter Unterschied zwischen den Allelfrequenzen innerhalb des Patienten- und Kontrollkollektivs (HOCM,  $\chi^2 = 0.274$ ; Kontrollkollektiv  $\chi^2 = 0.023$ )



### 3.5.2 T262T

Die Variante 4825C/T wurde durch SSCP-Analyse des Exons 7 anhand eines abweichenden Bandenmusters bei Raumtemperatur und bei 4°C identifiziert (Abb. 38a). Die DNA-Sequenzierung ergab eine C→T-Transition in Nukleotidposition +4825. Es handelt sich um einen stummen Polymorphismus (ACC und ACT kodieren für Threonin) (Abb. 39). Mittels PCR-Amplifikation (Primerpaar MYBP-C, Exon 7 F/R, vgl. Tab. 2) wurden PCR-Produkte von 210 Bp Länge erhalten.



**Abb 38a:** SSCP-Analyse von Polymorphismen in Exon 7 bei RT  
11= homozygot für Wildtyp  
12= heterozygot für die Variante  
22= homozygot für die Variante

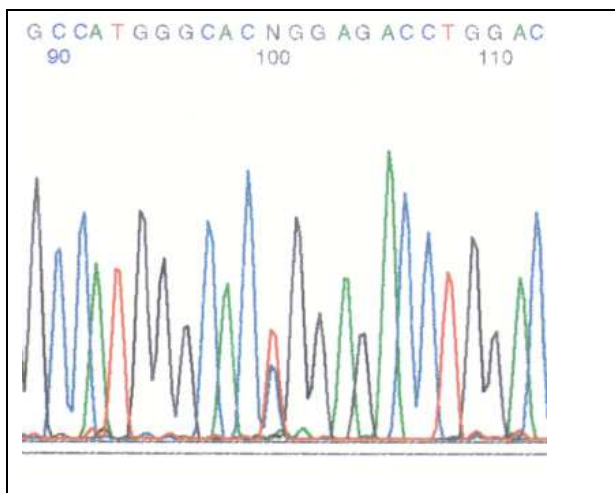
**Abb. 38b:** Restriktionsverdau mit *Hpa* II zum Nachweis der T262T Polymorphismus.  
M = Marker, UV = unverdautes Produkt  
11= homozygot für Wildtyp  
12= heterozygot für C>T Variante  
22 = homozygot für C>T Variante

Da die Variante innerhalb der Erkennungs-Sequenz der Restriktionsendonuklease *Hpa*II (= *Msp*I) liegt, war eine RFLP-Analyse zur Genotypisierung möglich (Abb. 38b).

Innerhalb dieses Fragments befinden sich eine Restriktionsschnittstelle für das Enzym *Hpa*II, wobei beim Vorhandensein der Variante in Position 4825 die Schnittstelle zerstört wird. Bei für das Wildtyp-Allel homozygoten Personen zeigen sich Banden von 119 Bp und 91 Bp Länge; bei Personen, die für Variante C>T heterozygot sind, erscheinen drei Banden von jeweils 210 Bp, 119 Bp und 91 Bp Länge. Bei Personen, die für die Variante C>T homozygot sind, findet sich entsprechend nur eine Bande von 210 Bp Länge.

Die Allelfrequenzen sind in Tabelle 16 aufgelistet, die Genotypverteilungen befinden sich im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht. Es besteht kein signifikanter Unterschied zwischen den Allelfrequenzen im Patienten- und im Kontrollkollektiv (HOCM:  $\chi^2=1.35$ , Kontrollkollektiv  $\chi^2=1.215$ ).

**Abb. 39:** Sequenzanalyse eines für die Variante T262T heterozygoten Patienten.



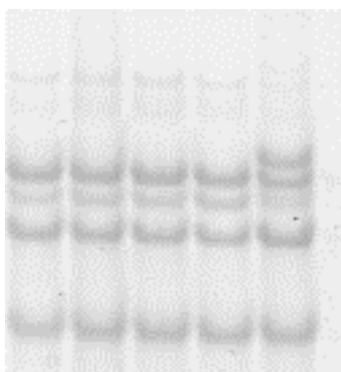
	HCM (n = 137)	Genotypen			Allelfrequenz	
		CC	CT	TT	C-Allel	T- Allel
beobachtet		103	33	1	239 (0.87)	35 (0.13)
erwartet		103.7	31	2.32		
	Kontrollen (n = 140)					
beobachtet		112	25	3	249 (0.89)	31 (0.11)
erwartet		110.9	27.4	1.7		

**Tab. 16:** Darstellung der beobachteten und erwarteten Genotypverteilungen und der Allelfrequenzen für die Variante T262T. Die Allelfrequenzen sind in Klammern angegeben.

### 3.5.3 R326Q

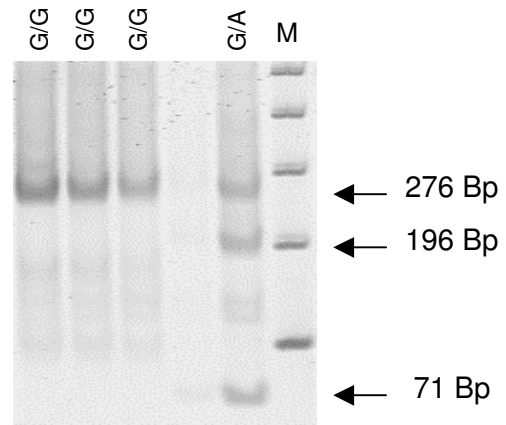
Bei der SSCP-Analyse des Exons 12 wurde bei sechs Patienten bei Raumtemperatur eine Laufmusterabweichung (n=106, DNA-Nr. 39, 45, 315, 928, 1325, 1636) beobachtet (Abb. 40). Für die Amplifikation wurde das Primerpaar Exon 12 F/R MYBP-C (Tab. 2) benutzt; es entstand ein 268 Bp langes PCR-Fragment. Mittels DNA-Sequenzierung konnte eine G→A Transition in Position +6396 identifiziert werden (Abb. 43). Hierdurch entstehen zwei Schnittstellen für die Restriktionsendonuklease *BfmI*, so dass eine RFLP-Analyse etabliert werden konnte. Nach Verdau mit *BfmI* zeigte sich in der Gelelektrophorese beim Wildtypen ein Bande von 267 Bp; bei heterozygoten Personen zeigten sich zwei zusätzliche Banden von je 196 Bp und 71 Bp Länge (Abb. 41). Im Protein wird ein basisches Arginin wird durch ein neutrales, polares Glutamin ersetzt, was zu einem Ladungswechsel führt.

11 11 11 11 12



**Abb. 40:** SSCP-Analyse von Exon 12  
11 = homozygot für WT, 12 = heterozygot für die Variante R326Q

**Abb. 41:** RFLP-Analyse zum Nachweis der R326Q-Variante mittels Restriktionsverdau mit *BfmI*.

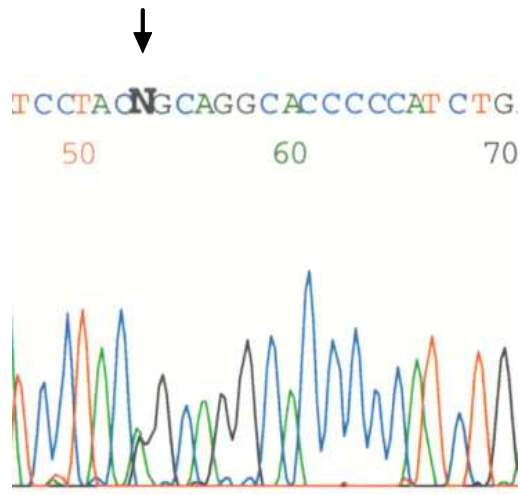


Die Aminosäure R 326 ist bei Mensch, Maus und Huhn konserviert (Abb. 42).

Mensch	307	DVWEIL <b>R</b> QAPPSEYERIAFQ	329
Maus	305	DVWEIL <b>R</b> QAPPSEYERIAFQ	325
Huhn	309	DVWEIL <b>R</b> KAPPSEYEKIAFQ	328

**Abb. 42:** Homologievergleich zwischen der Proteinsequenz von Mensch, Maus und Huhn. Der Aminosäurerest R 326 ist in allen Spezies konserviert.

**Abb. 43:** Sequenzanalyse der Variante (R326Q). Alle Personen waren heterozygot für diese Variante. Der Pfeil markiert die G>A Transition



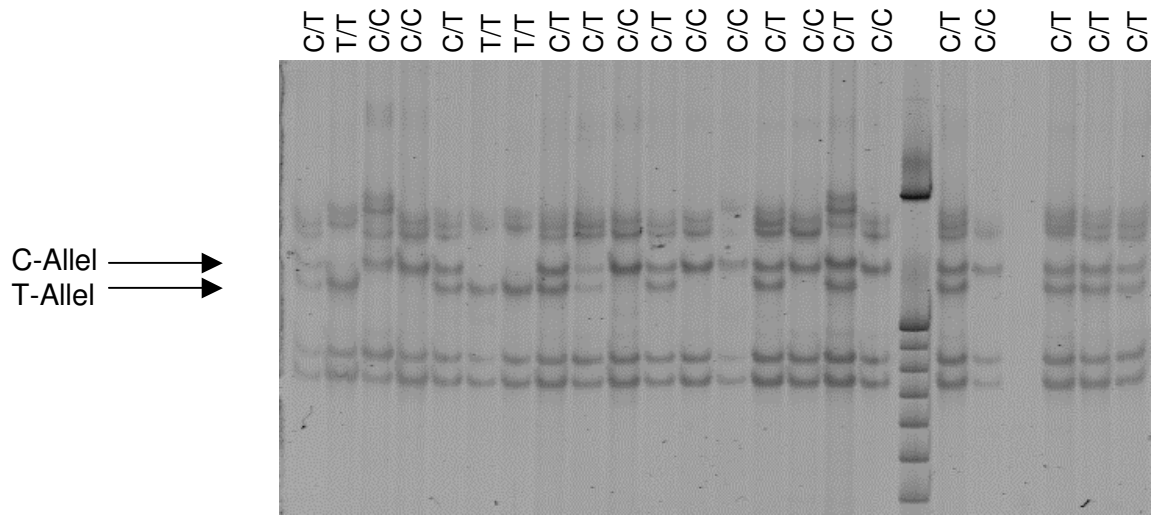
	HCM (n = 106)	Genotypen			Allelfrequenz	
		GG	GA	AA	G- Allel	A-Allel
<b>beobachtet</b>		100	6	0	206 (0.97)	6 (0.028)
<b>erwartet</b>		99.74	5.76	0.083		
	<b>Kontrollen</b> (n = 44)					
<b>beobachtet</b>		42	2	0	86 (0.98)	2 (0.023)
<b>erwartet</b>		42.26	1.984	0.023		

**Tab. 17:** Darstellung der beobachteten und erwarteten Genotypverteilungen und der Allelfrequenzen für die Variante R326Q. Die Allelfrequenzen sind in Klammern angegeben.

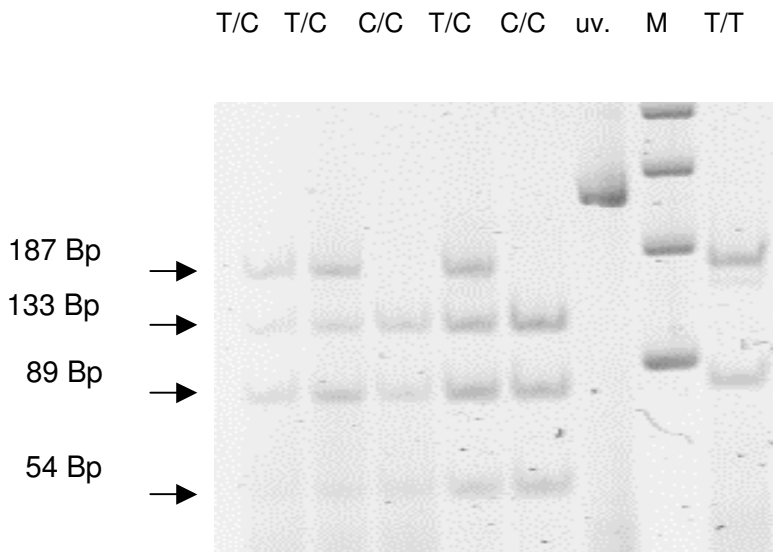
Die Genotypverteilungen befinden sich im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht. Es besteht kein signifikanter Unterschied zwischen den Allelfrequenzen innerhalb des Patienten- und Kontrollkollektivs.

#### 3.5.4 IVS12-24C/T

Abbildung 44 zeigt die SSCP-Analyse von Exon 13 bei Raumtemperatur. Das Bandenmuster läßt erkennen, dass es sich in dem untersuchten Fragment um zwei unabhängige Polymorphismen handelt. Bei der Sequenzierung wurde in Position +8175 ein C>T Basenaustausch gefunden, durch den eine Erkennungssequenz der Restriktionsendonuklease *EaeI* zerstört wird. Nach der RFLP-Analyse der entsprechenden PCR-Produkte erhielten wir beim Wildtypen drei Banden von jeweils 133 Bp, 89 Bp und 54 Bp Länge. Bei heterozygoten Vorliegen des C- bzw. T-Allels fanden sich vier Fragmente von jeweils 187 Bp, 133 Bp, 89 Bp und 54 Bp Länge; im homozygoten Fall fanden sich zwei Fragmente von 187 Bp bzw. 89 Bp Länge (Abb. 45). In der Tabelle 18 sind die ermittelten Allelfrequenzen dargestellt.



**Abb. 44:** SSCP-Muster von Exon 13 bei Raumtemperatur.



**Abb. 45:** Restriktionsverdau mittels *EaeI*.

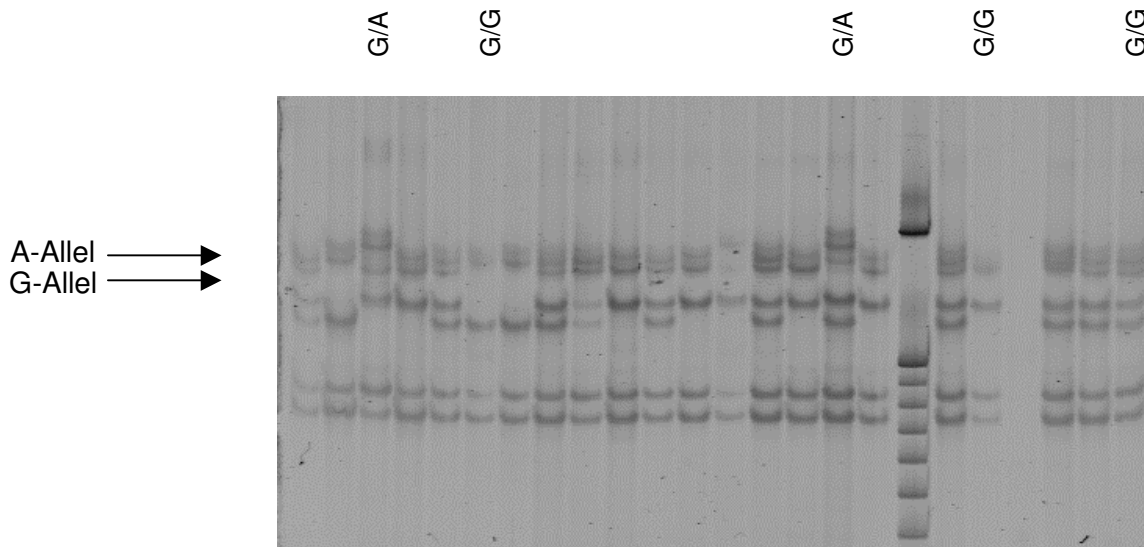
	HCM (n = 114)	Genotypen			Allelfrequenz	
		CC	CT	TT	C - Allel	T- Allel
<b>beobachtet</b>		63	43	8	169 (0.74)	59 (0.26)
<b>erwartet</b>		62.4 3	43.8 7	7.71		
	<b>Kontrolle n (n = 91)</b>					
<b>beobachtet</b>		37	44	10	118 (0.65)	64 (0.35)
<b>erwartet</b>		38.4 5	41.4 1	11.1 5		

**Tab. 18:** Darstellung der beobachteten und erwarteten Genotypverteilungen und der Allelfrequenzen für die Variante C8175T. Die Allelfrequenzen sind in Klammern angegeben.

Die Genotypverteilungen befinden sich nicht im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht; es besteht ein signifikanter Unterschied zwischen den Allelfrequenzen innerhalb des Patienten- und des Kontrollkollektivs (HOCM:  $\chi^2 = 0.033$ ; Kontrollkollektiv:  $\chi^2 = 0.34$ ).

### 3.5.5 IVS13+29G/A

Bei dem zweiten Polymorphismus, der in Exon 13 gefunden wurde, handelt es sich um eine G>A Transition in Position +8360 (Abb. 46).

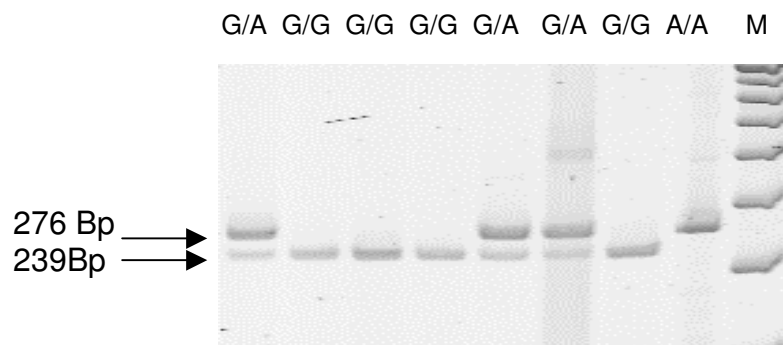


**Abb. 46:** SSCP-Analyse des Exon 13 bei Raumtemperatur

Die RFLP-Analyse wurde mit der Restriktionsendonuklease *AvaI* durchgeführt (Abb. 47). Beim Wildtyp zeigte sich bei der gelelektrophoretischen Abtrennung der Produkte eine Bande von 239 Bp Länge. Bei Personen, die für die Variante heterozygot sind, wurden zwei Banden von jeweils 276 Bp und 239 Bp Länge beobachtet. Bei homozygoten Personen fand sich eine Bande von 276 Bp Länge. Da es keine Konformationspolymorphismen gab, war eine Genotypisierung anhand der SSCP-Analyse nicht möglich. Patienten- und Kontrollkollektiv wurden (Tab. 22) mittels RFLP-Analyse untersucht.

**Abb.47:**

Restriktionsverdau  
der Variante  
IVS13+29G/A  
mittels *AvaI*





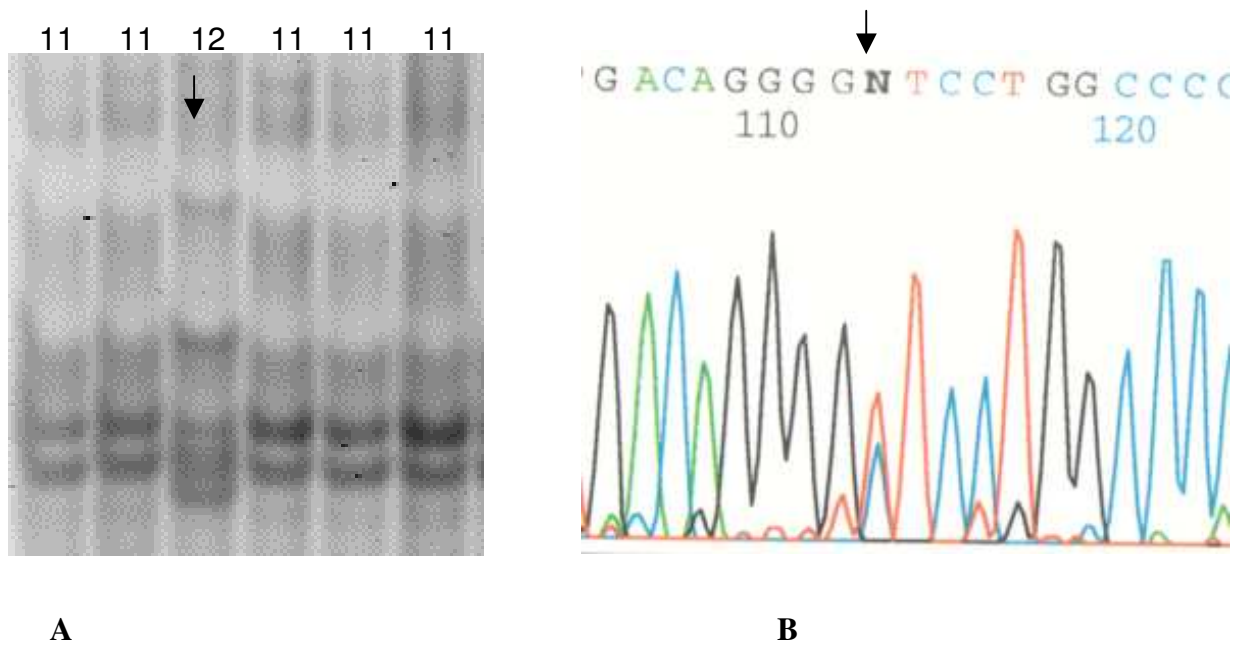
		Genotypen			Allelfrequenz	
		GG	GA	AA	G-Allel	A-Allel
	<b>HCM</b> (n = 106)					
<b>beobachtet</b>		74	30	2	178 (0.84)	34 (0.16)
<b>erwartet</b>		74.79	28.49	2.7		
	<b>Kontrollen</b> (n = 57)					
<b>beobachtet</b>		41	15	1	97 (0.85)	17 (0.15)
<b>erwartet</b>		41.18	14.54	1.28		

**Tab. 19:** Darstellung der beobachteten und erwarteten Genotypverteilungen und der Allelfrequenzen für die Variante G8359A. Die Allelfrequenzen sind in Klammern angegeben.

Die Genotypverteilungen befinden sich im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht. Es besteht kein signifikanter Unterschied zwischen den Allelfrequenzen innerhalb des Patienten- und Kontrollkollektivs (HOCM:  $\chi^2 = 0.094$ ; Kontrollkollektiv:  $\chi^2 = 0.025$ )

### 3.5.6 IVS19+47G/A

Bei der SSCP-Analyse von Exon 20 bei Raumtemperatur und bei 4°C wurde eine Laufmusterabweichung bei 5 Patienten (n = 106, DNA-Nr: 70, 115, 496, 1093, 1427) beobachtet (Abb. 48a). Da diese Variante durch keine kommerziell erhältliche Restriktionsendonuklease nachgewiesen werden kann, wurden PCR-Produkte dieses Fragments (Primerpaar: Exon 20 F/R MYBP-C, Tab. 2) sequenziert (Abb. 48b). Hierdurch wurde eine G>A Transition an Position 19 in Intron 19 (Nukleotidposition +10732) identifiziert.



**Abb. 48:** a): SSCP-Analyse von Exon 20 bei RT.  
 11 = homozygot für Wildtyp  
 12 = heterozygot für die Variante IVS19+47 G>A (Pfeil)  
 b) Sequenzanalyse zur Darstellung dieser Variante

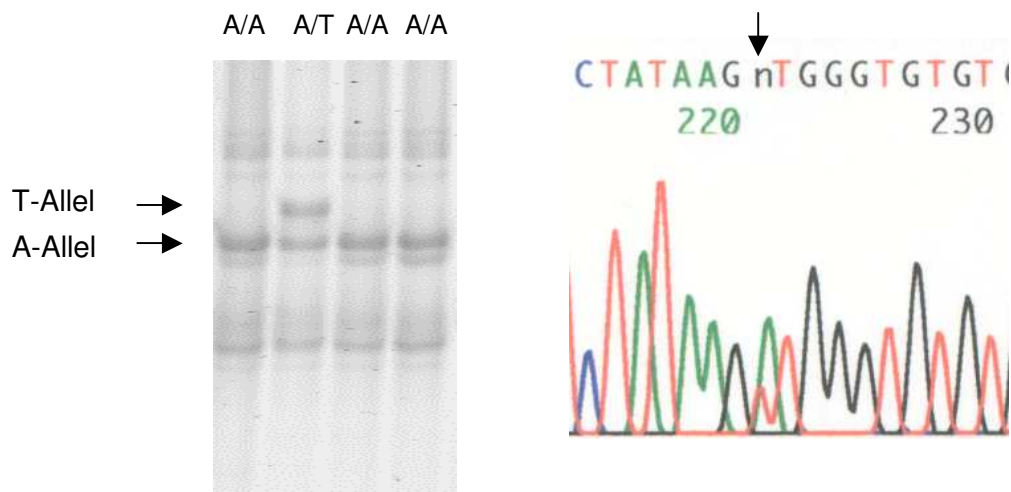
	HCM (n = 106)	Genotypen			Allelfrequenz	
		GG	GA	AA	G-Allel	A-Allel
<b>Beobachtet</b>		101	5	0	207 (0.98)	5 (0.024)
<b>Erwartet</b>		101.8	4.99	0.06		
	<b>Kontrollen</b> (n = 44)					
<b>Beobachtet</b>		42	2	0	86 (0.98)	2 (0.023)
<b>Erwartet</b>		42.26	1.984	0.023		

**Tab. 20:** Darstellung der beobachteten und erwarteten Genotypverteilungen und der Allelfrequenzen für die Variante G10732A. Die Allelfrequenzen sind in Klammern angegeben.

Die Genotypverteilungen befinden sich im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht. Es besteht kein signifikanter Unterschied zwischen den Allelfrequenzen innerhalb des Patienten- und Kontrollkollektivs (HOCM:  $\chi^2=0.066$ ; Kontrollkollektiv:  $\chi^2=0.025$ ).

### 3.5.7 IVS21+38A/T

Bei sechs Patienten (n = 106, DNA-Nr: 39, 45, 315, 928, 1325, 1636) konnte in der SSCP-Analyse von Exon 21 aufgrund eines veränderten Laufverhaltens bei Raumtemperatur und bei 4°C eine weitere Variante gefunden werden (Abb. 49a). Da es für den Nachweis dieser Variante keine Restriktionsendonuklease gibt, wurde diese Variante durch mehrmalige DNA-Sequenzierung bestätigt. Es fand sich an Position +12209 ein Austausch von A zu T (Abb. 49b). Alle Personen mit der Variante IVS21+38A/T zeigten zusätzlich die Variante R326Q (siehe Kapitel 3.5.3.).



**Abb. 49: a):** SSCP-Analyse von Exon 21 bei RT.

**b):** Sequenzanalyse dieser Variante

		Genotypen			Allelfrequenz	
	HCM (n=106)	AA	AT	TT	A-Allel	T- Allel
<b>beobachtet</b>		100	6	0	206 (0.97)	6 (0.028)
<b>erwartet</b>		99.74	5.76	0.083		
	Kontrollen (n = 44)					
<b>beobachtet</b>		42	2	0	86 (0.98)	2 (0.023)
<b>erwartet</b>		42.26	1.98	0.023		

**Tab. 21:** Darstellung der beobachteten und erwarteten Genotypverteilungen und der Allelfrequenzen für die Variante A12209T. Die Allelfrequenzen sind in Klammern angegeben.

Die Genotypverteilungen befinden sich im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht. Es besteht kein signifikanter Unterschied zwischen den Allelfrequenzen und innerhalb des Patienten- und Kontrollkollektivs (HOcM:  $\chi^2=0.094$ ; Kontrollkollektiv:  $\chi^2=0.025$ ).

### 3.5.8 Gemeinsames Auftreten der Varianten R326Q und IVS21+38A/T

Die Variante R326Q wurde nur bei Personen entdeckt, die die Variante IVS 21 + 38A/T aufwiesen. Die beiden Varianten kamen als heterozygot vor.

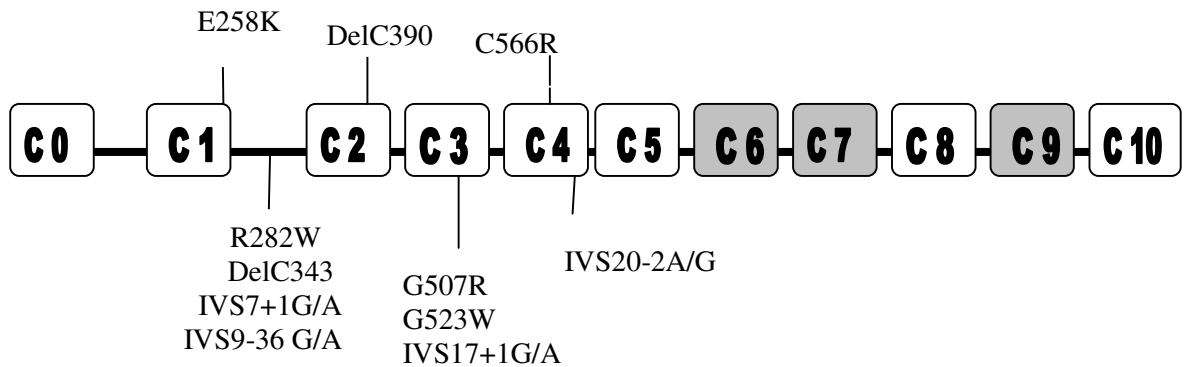
Die Variante IVS 21 + 38A/T wurde nur von unserer Studie berichtet (Erdmann et al., 2003). Die Variante R326Q wurde schon von verschiedenen Studien als eine Mutation oder Polymorphismus beschrieben (siehe Kapitel 4.5.2) aber ein Zusammenhang mit der Variante IVS 21 + 38A/T wurde noch nicht berichtet.

## 4. Diskussion

### 4.1 Der Krankheitsmechanismus von Mutationen im MYBP-C

Hypertrophe Kardiomyopathie wurde in unserem Patientenkollektiv überwiegend durch Mutationen im Myosinbindungsprotein C3 (MYBP-C) verursacht, gefolgt von Mutationen in der  $\beta$ -Myosin Schwerkette (MHY7) (Erdmann et al., 2003). Mehrere Studien kommen ebenfalls zu dem Ergebnis, dass die Mutationen in MYBP-C am häufigsten hypertrophe Kardiomyopathie verursachen (Van Driest et al., 2004, Richard et al., 2003 Jaaskelainen et al., 2002). Im Rahmen dieser Arbeit wurden 106 Patienten mit HCM (HO CM) auf Mutationen im MYBP-C-Gen (Exone 6 bis 21) untersucht. Neun Patienten kamen aus der Türkei, der Rest war deutscher Abstammung.

Als erster Schritt in der Aufdeckung der Mutationen wurden PCR-SSCP-Analysen durchgeführt. Diese Methode wird seit 1989 erfolgreich bei Mutationsanalysen von zahlreichen Genen eingesetzt. Die Sensitivität variiert abhängig von den verwendeten Gelelektrophoresebedingungen bei den einzelnen Arbeitsgruppen zwischen 70 und 95% (Marian, 2001). Der entscheidende Vorteil der SSCP-Analyse gegenüber anderen Mutationsdetektionsverfahren liegt in der schnellen, einfachen und kostengünstigen Durchführung. Eine Einschränkung stellt allerdings die Länge der Fragmente, die analysiert werden können (maximal 300 Bp) dar, denn bei längeren Fragmenten nimmt die Wahrscheinlichkeit, eine Mutation nachweisen zu können, stark ab (Hayashi und Yandell, 1993). Insgesamt wurden 11 Mutationen bei 12 Patienten festgestellt (siehe Abb. 57): Fünf **Missense-Mutationen** (E258K, R282W, G507R, G523W, C566R), zwei **Spleißmutationen** (IVS7+1G/A, IVS20-2A/G); zwei **Deletionen** (DelC343, DelC390), und zwei **Sequenzvarianten** mit unbekannter Krankheitsrelevanz (IVS9-36G/A, IVS17+11C/G). Die Spleißmutation IVS7+1G/A wurde bei zwei Patienten gefunden. Mittels Haplotyp-Analyse konnten wir nachweisen, dass es sich hierbei eine Founder-Mutation handelt. Founder-Mutationen für die HCM wurden zuvor nur in einer südafrikanischen Population berichtet (Moolman-Smook et al., 1999).



**Abb. 50:** Darstellung des MYBP-C Moleküls mit den beschriebenen Mutationen. Die acht IgI-Domänen sind weiß und die drei FnIII-Domänen grau dargestellt. C0 ist herzspezifisch, und zwischen C1 und C2 befinden sich die Phosphorylierungsstellen. Abbildung modifiziert nach Flashman et al., 2004.

Die oben genannten Deletionen und Spleißmutationen verursachen aller Wahrscheinlichkeit nach verkürzte MYBP-C-Moleküle. Als Krankheitsmechanismen werden im Folgenden die Haploinsuffizienz, ein dominant-negativer Effekt, Co-Translation und Funktionseinbußen aufgrund verkürzter Proteine (ohne “Gift”-Wirkung) diskutiert.

Bei den Mutationen R282W, C566R, IVS7+1G>A und IVS20-2A>G konnte die Kosegregation mit dem HCM-Phänotyp demonstriert werden. Drei Familien waren groß genug, um einen zwei-Punkt LOD-Score zu berechnen. Es handelte sich (1) um die Familie des Indexpatienten 45 (R282W). Hier wurde ein LOD-Score von 0.51 berechnet. (2) In der Familie des Indexpatienten 1331 (IVS7+1G>A) wurde ein LOD-Score von 1.12 berechnet, und (3) in der Familie des Indexpatienten 14 (IVS20-2A>G) ein LOD-Score von 0.54 (Erdmann et al., 2003).

Bei Trägern der Varianten E258K, DelC343, DelC390, G507R und G523W war eine Untersuchung von Familienmitgliedern nicht möglich. Die hier nachgewiesenen Mutationen und Polymorphismen wurden von Erdmann et al. (2001, 2003) veröffentlicht. Die Missense-Mutationen in Exon 6, 8, 17, 18 befinden sich an hoch konservierten Positionen. Die Patienten mit Missense-Mutationen waren klinisch besonders inhomogen. Die Indexpatienten 45, 1893, 1423, 1999 und 1989 zeigten eine späte ( $51 \pm 6$  Jahre)

Krankheitsmanifestation, während der Indexpatient 70 im Alter von 30 Jahren bereits eine erhebliche Hypertrophie zeigte (Erdmann et al., 2001).

Bei Patienten mit Mutationen, die eine Verkürzung des MYBP-C verursachen, fanden sich frühere Krankheitsmanifestation und schwerere Verläufe. Sie zeigten die höchste Rate von Myektomie, TASH und ICD. (Erdmann et al. 2001 und 2003).

#### **4.1.1 Haploinsuffizienz**

Eine zu Haploinsuffizienz führende Mutation resultiert in einem Proteinverlust, sei es, dass das Produkt des Gens gar nicht oder nur als inaktives Fragment entsteht oder, dass das fehlerhafte Produkt rasch eliminiert wird. In beiden Fällen wäre das mutierte Gen funktionell ein Nullallel. Die gestörte Gesamtaktivität des Proteins wäre Folge eines Mangels an normalen Genprodukten (Vosberg, 1998). Bis heute konnte der Krankheitsmechanismus von Mutationen im MYBP-C-Gen nicht eindeutig aufgeklärt werden. Eingehendere Untersuchungen wurden erstmalig 1997 in der Arbeitsgruppe von Rottbauer durchgeführt. Es wurden endomyokardiale Biopsien eines betroffenen Patienten mit einer Splice-Donor-Mutation untersucht. Aufgrund der Art der Mutation wurde zuerst ein verkürztes MYBP-C vermutet. Die gefundene Menge an mutierter mRNA war im Vergleich zur Menge an Wildtyp-mRNA nur leicht (10% zu 15%) vermindert. Bei der Western Blot-Analyse konnte jedoch kein mutiertes Protein nachgewiesen werden. Das Wild-Typ-Protein schien auf normalem Niveau exprimiert zu sein. Die Ergebnisse legen nahe, dass die verkürzten Proteine wahrscheinlich exprimiert wurden (fast normale mRNA-Menge), aber rasch degradiert wurden und daher nicht in das Sarkomer integriert wurden. Dieser Mechanismus entspricht einer Haploinsuffizienz, da die betroffenen Patienten noch über ein gesundes Allel verfügen.

#### **4.1.2 Dominant-negative Wirkung (“poison polypeptide”)**

Diese stellt sich dann ein, wenn der Multiproteinkomplex, also zum Beispiel Aktin- und Myosinfilamente, neben den normalen auch mutierte, dysfunktionale Proteine enthalten. In diesem Fall kann die Anwesenheit der mutierten Proteine Fehlfunktionen des gesamten Komplexes zur Folge haben (Vosberg, 1998). Gilbert et al. (1999) haben ebenfalls das

Vorhandensein von stabilen verkürzten Proteinen in einem transgenen Mausmodell demonstriert. Die verkürzten Proteine wurden nicht korrekt in das Sarkomer aufgenommen und waren nur schwach an die Sarkomerproteine gebunden. Möglicherweise behindern bereits geringe Mengen an mutiertem Protein eine korrekte Funktion des gesunden Proteins durch eine Fehlintegration oder Nichtintegration in den dicken Filamenten stark. Zu dem gleichen Ergebnis kommt die Arbeitsgruppe von Moolman, die im Jahr 2000 eine Mutation in Exon 25 veröffentlicht hat, die voraussichtlich zu verkürzten Proteinen führt. Die Arbeitsgruppe von Yang et al. (1998) untersuchte ebenfalls Mäuse, die eine Mutation im MYBP-C-Gen hatten. Diese Mutation kodierte voraussichtlich Proteine, denen Myosin- und Titin-Bindungsstellen fehlten. Das mutierte Protein wurde in nachweisbarer Menge exprimiert und hatte einen ungünstigen Effekt auf Organisation und kontraktile Funktion der kardialen Sarkomere.

#### **4.1.3 Kotranslation**

Mutierte mRNAs von kardialem MYBPC stören die Translation der anderen sarkomeren Komponenten, so dass ein korrektes Zusammenfinden (assembly) der sarkomeren Strukturen beeinträchtigt wird.

#### **4.1.4 Funktionseinbußen des MYBP-C ohne “Gift”-Wirkung**

Vermutlich kommt es bei verkürztem MYBP-C durch fehlerhafte Kragenformation zur falschen Platzierung des MYBP-C um das Myosin. Die Entfernung des Kragens würde die Kopfflexibilität steigern und den Myosinkopf in unmittelbare Nähe von Aktins bringen und dadurch die Wahrscheinlichkeit Bildung von Querbrücken erhöhen (Korte et al., 2003). Die genauen Mechanismen, die zur Ausbildung der HCM führen, sind jedoch letztlich noch unbekannt (Flashman et al., 2004).

#### **4.1.5 Störung der Phosphorylierung**

Alle gefundenen Missense-Mutationen sind in der Nähe von Phosphorylierungsstellen lokalisiert. Eine Hypothese zur Entstehung der Hypertrophen Kardiomyopathie ist eine Störung der korrekten Phosphorylierung (Nimura et al., 1998, Erdmann et al., 2001).



MYBP-C wird während der adrenergen Stimulation des Myokards phosphoryliert, was eine Zunahme der systolischen Wandspannung mit sich bringt (Gautel et al., 1995). Kommt es zu keiner korrekten Phosphorylierung, fällt auch der Aufbau der systolischen Wandspannung geringer aus.

#### **4.1.6 Polymorphismen**

In MYBP-C wurden auch Polymorphismen entdeckt (Erdmann et al., 2003; Van Driest et al., 2004). Neben für die HCM verantwortlichen Mutationen wurden sieben Polymorphismen gefunden: S236G, T262T, R326Q, IVS12-24C/T, IVS13+29G/A, IVS19+47G/A, IVS21+38A/T.

Ein Polymorphismus wurde ursprünglich definiert als ein genetischer Locus, für den es mehrere Allele gibt, wenn die Allelfrequenz des selteneren Allels in der Bevölkerung mindestens ein Prozent beträgt. Diese Grenze sollte neutrale Varianten von Mutationen mit ungünstigen Auswirkungen abgrenzen, ist aber unscharf. In der medizinischen Genetik wird mit Polymorphismus auch häufig eine variable Stelle im Genom bezeichnet, die ohne phänotypische Auswirkungen bleibt (Den Dunnen et al., 2001). Das Genom des Menschen ist weitgehend sequenziert, es konnten etwa 22000 bis 30000 Gene identifiziert werden. Obwohl das menschliche Genom zu 99,9% übereinstimmt, weiß man mittlerweile, dass die menschliche DNA-Sequenz durch eine erhebliche inter-individuelle Variabilität gekennzeichnet ist. Man kann sagen, dass jeder Mensch ein einzigartiges Genom trägt. Die verbleibenden 0,1% (s.o.) des Genoms stehen für etwa 3.000.000 Sequenzunterschiede, von denen der größte Teil jedoch sehr wahrscheinlich ohne phänotypische Konsequenz bleibt (Cichon et al., 2002).

#### **4.2 Die Missense-Mutationen**

Insgesamt wurden fünf Missense-Mutationen (E258K, R282W, G507R, G523W, C566R) entdeckt. Alle diese Mutationen kommen an evolutionär konservierten Aminosäuren vor. Solchen über die Evolution an bestimmten Stellen konservierten Aminosäuren kommt häufig eine wichtige Bedeutung zu, sei es die Erhaltung der Proteinstruktur oder eine funktionelle Rolle (Vikstrom KL und Leinwand LA, 1996). Es ist daher wahrscheinlich,

daß Missense-Mutationen von konservierten Aminosäuren besonders folgenschwer für die Funktion des Proteins sind.

Die Mutationen E258K und R282W kommen in den Domänen C1 und C2 vor, die als „Bremse“ auf eine spezifische Stelle der Myosinköpfe wirken. Jedoch genügt dies, um sowohl die allgemeinen Querbrückenzyklusraten zu reduzieren als auch die Relaxation der Sarkomere zu fördern (Flashman et al., 2004). Wahrscheinlich verursachen diese zwei Mutationen, möglicherweise auch alle fünf Missense-Mutationen, die in den Domänen C1-C4 lokalisiert sind, eine Aufhebung oder Beeinträchtigung der Funktion dieser „Bremse“ (s. 4.1.4).

#### **4.2.1 E258K**

Diese Variante wurde bei Indexpatient 1541 in der Nähe der Spleißstelle in Exon 6 identifiziert (siehe Kapitel 3.1.1.). Diese Variante wurde in verschiedenen Studien als HCM-verursachend beschrieben (Niimura et al., 1998; Erdmann et al., 2003; Richard et al., 2003; Nanni et al., 2003; Alders et al., 2003; Andersen et al., 2004; Van Driest et al., 2004). In den oben genannten Studien ist diese Variante als eine Missense-Mutation oder als eine Spleißvariante eingestuft worden. Dies erscheint auch uns plausibel, da sich die Variante in der Nähe des Spleißsignals befindet, was das RNA-Spleißen verändern könnte und somit zur Synthese eines veränderten Proteins führen könnte. Es wird vermutet, dass diese Variante zu einem dominant negativen Effekt führt, da das gekürzte Polypeptid wahrscheinlich nicht korrekt in das Sarkomer integrieren kann.

Zudem betrifft diese Variante eine hochkonservierte Aminosäure und liegt in der Nähe der drei herzspezifischen Phosphorylierungsstellen (Niimura et al., 1998). Nanni et al. vermuten, dass die Variante E258K pathophysiologisch relevant ist, da die Phosphorylierungsstellen beeinträchtigt werden könnten. Durch einen dominant negativen Mechanismus wird die kontraktile Energieentwicklung während adrenerger Stimulation durch inkorrekt phosphoryliertes MYBP-C verschlechtert. Nanni et al. beschreiben einen bei Studieneinschluß 38 Jahre alten männlichen Patienten, bei dem die Variante E258K nachgewiesen werden konnte. Es fand sich eine ausgeprägte Hypertrophie und Obstruktion des linksventrikulären Ausflustrakts; das IVS maß 24mm, der LVEDD betrug 39mm, die LVEF 66%, LVOTO 60. Klinisch fanden sich Angina und Belastungsdyspnoe NYHA II.

Die Arbeitsgruppe von Andersen et al. (2004) dagegen diskutiert eine Haploinsuffizienz als Krankheitsmechanismus bei der Variante E258K. Sie identifizierten zwei Arten von mRNA (Wildtyp und Exon-6-Skipping). Ihrer Ansicht nach verursacht diese Spleißmutation eine Leserasterverschiebung (frameshift). Das dann entstehende vorzeitige Stop-Kodon führt zur Bildung von verkürzten Proteinen, die rasch degradiert werden (Andersen et al., 2004). Eine effektive Integration in das Sarkomer scheitert dieser Theorie zufolge eher an einem quantitativen Defizit an funktionsfähigem MYBP-C. Einschränkend muß gesagt werden, daß ein Nachweis von aberranten mRNA-Spleißprodukten kardialem Gewebe in dieser Studie nicht erbracht wurde.

#### **4.2.2 R282W**

Diese Variante wurde bei dem Indexpatienten 45 in Exon 8 identifiziert. Aufgrund der Mutation kommt es in Codon 282 zum Austausch der positiv geladenen Aminosäure Arginin (CGG) gegen die neutrale Aminosäure Tryptophan (TGG) (siehe Kapitel 3.1.2.). Die Variante wurde erstmalig von Erdmann et al. (2001) beschrieben. Sie kommt innerhalb des kardial spezifischen, evolutionär hochkonservierten LAGGRRIS-Motivs zwischen den Domänen C1 und C2 vor. Bei der Variante R282W kommt es zu einer Ladungsänderung und zum Verlust der Phosphorylierungsstellen (Erdmann et al., 2001). Die Verbindung mit dem HCM-Phänotypen konnte 2003 demonstriert werden (Erdmann et al., 2003).

Richard et al. (2003) fanden in der Nähe der Aminosäure 282 zwei weitere Missense-Mutationen, G278E (betroffen ist das Nukleotid an Position +6011, wo es einen G>A-Austausch gibt) und G279A (betroffen ist das Nukleotid an Position +6014, wo es einen G>C-Austausch gibt). Auch diese beiden Mutationen wurden als ursächlich für HCM eingestuft, was die Bedeutung des LAGGRRIS-Motivs für die Funktion des MYBP-C unterstreicht.

#### **4.2.3 G507R**

Diese Variante wurde bei dem Indexpatienten 70 in Exon 17 identifiziert. Aufgrund dieser Substitution kommt es im Codon 507 zum Austausch der neutralen Aminosäure Glycin (GGG) gegen die positiv geladene Aminosäure Arginin (AGG) (siehe Kapitel 3.1.3.). Die

Variante ist bislang nicht beschrieben worden. Sie befindet sich in der Nähe von vier Mutationen, die von Niimura et al. 1998 als HCM verursachend beschrieben wurden: R502Q, R451Q, R495Q und E258K. Diese vier Mutationen scharen sich um ein 244 Aminosäuren langes Segment, das die Phosphorylierungsdomain des MYBP-C umspannt. Richard et al. haben 2003 in der Nähe der Variante G507R in Exon 17 die Missense-Mutation R502W beschrieben. Da die Variante G507R an einer konservierten Stelle vorkommt (siehe Abbildung 10), und zusätzlich durch einen Ladungswechsel die Phosphorylationsstellen beeinträchtigt, könnte durch sie die Proteinfunktion erheblich gestört sein und es so zur Ausbildung einer HCM kommen.

Im Gegensatz zu unseren Ergebnissen bezeichnen Van Driest et al. (2004) die Variante G507R nicht eindeutig als krankheits-relevante Mutation sondern als Polymorphismus.

#### **4.2.4 G523W**

Bei dem Indexpatienten 1147 wurde eine G>T Transversion an Position +9188 entdeckt. Durch die GGG>TGG Substitution in Codon 523 kommt es zum Austausch des neutralen und unpolaren Glycin gegen das neutrale, polare Tryptophan (siehe Kapitel 3.1.4.). Aufgrund des Ladungswechsels innerhalb des Proteins könnte es zu einer Veränderung der Tertiärstruktur kommen, was die Funktion des Proteins beeinträchtigen könnte. Zudem befindet sich die Aminosäure G523 in einem konservierten Rest und befindet sich in der Nähe von Phosphorylationsstellen. Durch die Mutation könnte es zu einer HCM-verursachenden Phosphorylationsstörung kommen.

#### **4.2.5 C566R**

Diese Variante wurde bei dem Indexpatienten 1423 in Exon 18 identifiziert (siehe Kapitel 3.1.5.). Die Variante C566R liegt innerhalb eines evolutionär hochkonservierten Segments, das den Phosphorylierungsstellen des Moleküls benachbart ist. In der Nähe dieser Variante wurden weitere Missense-Mutationen beschrieben, die für die Entstehung der hypertrophen Kardiomyopathie ursächlich zu sein scheinen (Erdmann et al., 2001; Niimura et al., 1998). Van Driest et al. haben 2004 die Missense-Mutation E542Q bestätigt, die 1997 von Carrier et al. als Missense- oder Spleißmutation beschrieben wurde. Van Driest et al. (2004) fanden außerdem eine Deletion in Codon 566 (C566fs/19), die zu einer Leserasterverschiebung

führt (alle nachfolgend angehängten Aminosäuren sind im falschen Leseraster, was zur Bildung eines Nonsense-Proteins führt). Ferner wurde von der gleichen Arbeitsgruppe ein Aminosäureaustausch von Leucin zu Methionin an Position 545 gefunden (L545M; CTG>ATG). Diese Variante wurde als ein seltener Polymorphismus eingestuft.

Aufgrund der räumlichen Nähe der Variante C566R zu diesen anderen, krankheitsverursachenden Mutationen gehen wir davon aus, dass diese Variante durch eine Störung der Phosphorylierung des Proteins und einen Ladungswechsel innerhalb des Proteins zur Krankheitsentstehung führt.

### **4.3 Spleißmutationen und Deletionen**

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei Spleißmutationen, IVS7+1G>A und IVS20-2A>G (siehe Kapitel 3.2.1 und 3.2.2.) und zwei Deletionen, DelC343 und DelC390 in Exon 12 und 13 identifiziert (siehe Kapitel 3.3.1 und 3.3.2.) Diese Varianten wurden bei der Kontrollgruppe nicht gefunden.

Van Driest et al. haben 2004 eine Deletion C (D389fs/15) in der Nähe der DelC390 in Exon 13 als eine aufgrund einer Leserasterverschiebung vermutlich HCM-verursachende Mutation beschrieben. Die vier hier beschriebenen Varianten wurden erstmalig von Erdmann et al. (2001 und 2003) berichtet. Auch sie führen zu einer Verschiebung des Leserasters mit vorzeitigem Stop-Codon und Verlust des C-terminalen Endes, das die Myosin- und Titinbindenden Anteile des Proteins enthält. Pathophysiologisch könnte in diesem Fall eine Haploinsuffizienz zugrunde liegen.

### **4.4 Varianten mit unbekannter Pathogenität**

Bei den Varianten IVS17+11C>G und IVS9-36G>A ist der Krankheitsmechanismus unklar. IVS17+11C>G liegt in einem Intron vor und beeinflusst keine Spleißstellen. Bei Variante IVS9-36G>A könnte es sich um eine Spleißmutation handeln (siehe Kapitel 3.4.1, 3.4.2). Diese Varianten sind neu und wurden zum ersten Mal von Erdmann et al. (2003) als seltene Varianten mit unbekannter Pathogenität veröffentlicht. Sowohl IVS17+11C>G als auch IVS9-36G>A wurde bei der Kontrollgruppe nicht gefunden.

## 4.5 Polymorphismen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden insgesamt sieben Polymorphismen identifiziert: S236G, T262T, R326Q, IVS12-24C/T, IVS13+29G>A, IVS 19+47G/A und IVS 21+38A/T (siehe Kapitel 3.5.).

Nur die Varianten S236G und R326Q sind vorbeschrieben, die übrigen Polymorphismen wurden bis heute nur von Erdmann et al. (2003) veröffentlicht. In dieser Veröffentlichung wurden die Teile dieser Dissertation veröffentlicht.

### 4.5.1 S236G

Mittels Sequenzierung konnte die Variante S236G als eine A→G Transition in Nukleotidposition +4229 in Exon 6 identifiziert werden. Durch den Polymorphismus wird Serin, eine neutrale Aminosäure gegen Glycin ausgetauscht, das ebenfalls neutral ist und eine polare Seitenkette hat (siehe Kapitel 3.5.1).

Jaaskelainen et al. (2002) haben diese Variante in 22 von 111 Kontrollen identifiziert, und sie fanden keine Cosegregation mit dem HCM-Phänotyp. Daher wird vermutet, dass es sich bei dieser Variante um einen neutralen Polymorphismus handelt. Dieser Ansicht schließen sich auch Morner et al. (2003) an, die die Variante S236G als Polymorphismus einstufen, der in 16 von 46 Personen gefunden wurde. Auch Van Driest et al. (2004) betrachten die Variante S236G als nicht ursächlich für HCM.

### 4.5.2 R326Q

Diese Variante wurde in Exon 12 identifiziert. Insgesamt 6 Patienten waren betroffen (siehe Kapitel 3.5.3.). Die Variante wurde zuvor von unabhängigen Arbeitsgruppen gefunden (Maron et al., 2001; Niimura et al. 2002; Morner et al., 2003; Richard et al., 2003; Jaaskelainen et al., 2002; Erdmann et al., 2003; Van Driest et al., 2004). Die Assoziation mit HCM ist jedoch umstritten.

Da diese Variante eine hochkonservierte Aminosäure (s. Abb. 49) betrifft, die im MYBP-C Motiv in der Nähe der Phosphorylierungsstellen vorkommt, vermuten einige Autoren einen Zusammenhang mit HCM (Morner et al., 2003; Maron et al., 2001; Richard et al., 2003). Zudem wurde in der Studie von Morner et al. (2003) diese Variante nicht bei Gesunden gefunden.

Diese Variante wurde von Jaaskelainen et al. (2002) nicht eindeutig zugeordnet. In ihrer Studie konnten sie diese Variante bei gesunden Probanden nachweisen, und gehen daher von einem neutralen Polymorphismus aus. Unter Berücksichtigung der Beobachtung, daß in der finnischen Bevölkerung viele Varianten (neutrale Polymorphismen oder krankheitsverursachende Mutationen) einen Founder-Effekt reflektieren können, vermuten die Autoren, daß es sich bei der Variante R326Q tatsächlich um eine Mutation mit gemeinsamen Vorfahren handeln könnte, die einen leichten HCM-Phänotyp verursacht.

Niimura et al. (2002) haben diese Variante bei einem Patienten mit frühem Beginn der hypertrophischen Kardiomyopathie festgestellt. Allerdings wurde in dieser Studie diese Variante auch bei einer gesunden Kontrollperson nachgewiesen. In dieser Publikation wurde am Ende nicht deutlich, ob diese Variante als eine krankheitsverursachende Mutation oder als ein seltener Polymorphismus eingestuft wird.

Oakley et al. (2004) vermuten, dass die sarkomeren Dysfunktionen, die mit dieser Mutation assoziiert sind, wahrscheinlich minimal sind. Auch Van Driest et al. (2004) konnten die Variante R326Q bei HCM-Patienten nachweisen, haben sie jedoch aufgrund der übrigen Datenlage auch als einen seltenen Polymorphismus eingestuft. Richard et al. (2003) haben diese Variante eindeutig als eine Missense-Mutation eingestuft die HCM-verursacht.

Unserer Ansicht nach (Erdmann et al., 2003), handelt es sich bei der Variante R326Q um einen seltenen Polymorphismus, da in unserer Studie diese Variante bei gesunden Probanden nachgewiesen werden konnte.

### **4.5.3 Häufige Varianten**

Die Varianten S236G, T262T, IVS12-24C/T, IVS13+29G>A fanden sich häufig sowohl bei Patienten als auch bei Kontrollen, daher gehen wir davon aus, daß es sich bei diesen Varianten um häufig vorkommende Polymorphismen handelt.

### **4.5.4 Seltene Varianten**

Die Variante IVS19+47G/A wurde bei 5 Patienten und 2 von 46 gesunden Kontrollen festgestellt. Die Variante IVS21+38A/T wurde bei den Index-Patienten 39, 45, 315, 928, 1325 und 1636 identifiziert. Die gleichen Patienten hatten die Variante R326Q in Exon 12.

Da diese seltenen Varianten auch in gesunden Kontrollen vorkamen, sind wir der Ansicht, daß es sich um seltene Varianten handelt, die nicht zu HCM führen.

#### **4.5.5 Mutationen in demselben Gen verursachen HCM und DCM**

55% der HCM-Fälle treten familiär und 45% sporadisch auf. Mehr als 150 HCM-verursachende Mutationen wurden in unterschiedlichen Genen gefunden (Tab. 1) (Bennett et al., 1986). Mindestens elf von diesen Genen kodieren Proteinkomponenten des Sarkomers. Bei molekulargenetischen Untersuchungen an HCM-Patienten wurden ausschließlich Mutationen in Proteinen des Sarkomers entdeckt, welche als ursächlich für die HCM angesehen werden. Bei der dilatativen Kardiomyopathie (DCM) wurden Mutationen in zytoskeletalen Proteinen festgestellt (Chien et al., 2000 und Hoshijima et al., 2002). Daher entstand das Konzept, dass Mutationen in Proteinen des Zytoskeletts immer zu einer DCM und Mutationen in Sarkomerproteinen immer zu einer HCM führen. Es wurden jedoch in den letzten Jahren sowohl klinische als auch experimentelle Daten veröffentlicht, die dieses initiale Konzept infrage stellen. So wurde gezeigt, dass Mutationen im selben Gen zu einer HCM oder zu einer DCM führen. Mutationen im  $\beta$ -MHC-Gen, Tropomyosin-Gen, Titin-Gen, Troponin T-Gen oder MYBP-C-Gen können entweder zu einer DCM oder zu einer HCM führen (Marian et al., 2001). Etwa 10% der HCM-Fälle entwickeln eine linksventrikuläre Dilatation ähnlich wie bei der DCM (Hayashi et al., 2004).

#### **4.6 Schlussfolgerung**

Für eine genotypische Untersuchung der HCM- Patienten zur Feststellung der Mutationen für eine deutsche beziehungsweise eine europäische Population sollte als erstes das Mutations-Screening mit MYBP-C und MYH7 erfolgen. Dadurch wird die Entdeckung von 80% von allen HCM-verursachenden Mutationen ermöglicht. Danach sollten TNNT2, TPM1, MYL2, und TNNI3 zu einer genetischen Diagnose von 10-15 % von allen Fällen führen. An der dritten Stelle können Gene wie MYL3, TTN, oder ACTC untersucht werden. Diese Gene sind sehr selten für eine HCM verantwortlich (Erdmann et al., 2003).



## 5. Zusammenfassung

### **Genetische Variabilitäten im humanen kardialen myosinbindenden Protein C-Gen und deren Bedeutung für die hypertrophe Kardiomyopathie**

Die hypertrophe Kardiomyopathie (HCM) ist eine primäre kardiale Störung mit einer heterogenen klinischen und morphologischen Expression (Ogimoto et al., 2004).

Eine Ursachennanalyse der HCM bei 62 Patienten und deren Familien aus mehreren Ländern führte zu folgenden Resultaten: Mutationen wurden überwiegend in den Genen für MYH7 und das kardiale Myosinbindenden Protein-C (MYBP-C) identifiziert (Voßberg et al., 2003). In der größten Studie (Richard et al., 2003) wurden Mutationen in MYBP-C Gen bei 42% der Patienten mit HCM beobachtet.

Zu Beginn dieser Dissertation (1999-2001) wurde angenommen, dass 15% der gesamten Mutationen, die HCM/HOCM verursachen in MYBP-C-Gen vorkommen. Diese Mutationen wurden mit einem späten Beginn und benignem Verlauf beschrieben (Maron et al., 2001). Die Rolle und Häufigkeit der Mutationen in MYBP-C-Gen wurde damals unterschätzt.

In unserer Studie wurden 80% der HCM verursachenden Mutationen im kardialen myosinbindenden Protein C-Gen (MYBP-C) und MYH7 – Gen entdeckt (Erdmann et al., 2003). Wir haben die größte Zahl von Mutationen in MYBP-C-Gen (18.5%) gefunden mit einem breiten Spektrum von Mutationstypen. Das niedrigste Alter zum Zeitpunkt der Diagnosestellung lag bei Patienten mit Mutationen, die Proteinabbruch verursachen bei  $34 \pm 11$ . Diese Gruppe zeigte die höchste Rate an Myoektomie, TASH, und ICD ( $p < 0.05$ ) (Erdmann et al., 2001, 2003). Bei mehr als 60% der Patienten mit Mutationen ohne Proteinabbruch wurden invasive Prozedere durchgeführt.

Wir haben zum ersten Mal ein systematisches Mutationsscreening in einer großen Kohorte von nicht verwandten Patienten durchgeführt. Die bisherige Studien untersuchten die Frequenz der Mutationen, die hauptsächlich auf Familienstudien basiert waren (Erdmann et al., 2003).

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurde ein Mutations-Screening mittels PCR-

SSCP-Analyse durchgeführt. Insgesamt wurden 106 nicht verwandte Patienten mit HCM oder HOCM in Hinblick auf Mutationen im MYBP-C-Gen (Exon 6 bis 21) von 1999 bis 2001 untersucht.

Diese Patienten wurden zum großen Teil im Deutschen Herzzentrum Berlin (DHZB) behandelt. Das Patientenkollektiv bestand aus 106 nicht verwandten Patienten (68 männlichen und 38 weiblichen Personen) im Alter von 12-82 Jahren. Das Durchschnittsalter betrug 53,2 Jahre. Das Alter zum Zeitpunkt der Diagnosestellung lag bei  $45,5 \pm 14$  Jahren. Neun von 106 Patienten sind türkischer, alle anderen Patienten deutscher Abstammung. Die Patienten wurden zum Ausschluss anderer Hypertrophieursachen nach international anerkannten Kriterien (Maron, McKenna et al., 2003), 24h-EKG, Echokardiographie und Angiographie diagnostiziert. Patienten, bei denen bereits eine Myektomie durchgeführt worden war, wurden unabhängig von echokardiographischen Kriterien in die Studie eingeschlossen.

Die ermittelten Varianten wurden durch Sequenz-Analyse und anschließendem RFLP identifiziert. Es wurden elf Mutationen definiert und die damit assoziierten Phänotypen ermittelt. Die Familienmitglieder der Mutationsträger wurden so weit verfügbar untersucht.

Die nachgewiesenen Mutationen lauten wie folgt: fünf Aminosäuresubstitutionen (E258K, R282W, G507R, G523W, C566R), zwei Spleissmutationen (IVS7+1G/A, IVS20-2A/G), zwei Deletionen (DelC343, DelC390) sowie zwei Sequenzvarianten mit unbekannter Pathogenität (IVS9-36 G/A, IVS17+11C/G).

Es wurde festgestellt, dass die oben genannten Deletionen und Spleissmutationen voraussichtlich gekürzte MYBP-C-Moleküle verursachen.

Die Spleissmutation IVS7+1G/A wurde lediglich bei zwei Patienten festgestellt. Mit Hilfe einer Haplotyp-Analyse gelang es, nachzuweisen, dass es sich bei der Spleissmutation IVS7+1G/A um eine Founder-Mutation handelt. Die Spleissmutation IVS7+1G/A ist die erste Founder-Mutation in einer europäischen Population und wurde von unserer Studie ermittelt (Erdmann et al., 2003).

Neben den für die HCM verantwortlichen Mutationen wurden folgende sieben Polymorphismen festgestellt: S236G, T262T, R326Q, IVS12-24C/T, IVS13+29G/A, IVS19+47G/A, IVS21+38A/T. Diese Varianten wurden zusätzlich beim gesunden Kontroll-Kollektiv nachgewiesen.

Lediglich die Varianten E258K, G507R, S236G und R326Q wurden bereits von anderen Arbeitsgruppen dokumentiert. Sämtliche bislang von unserer Arbeitsgruppe entdeckte Varianten wurden von (Erdmann et al., 2001 und 2003) veröffentlicht.

In dem großen Krankengut des DHZB, das ein Überweisungskrankenhaus für Patienten mit Kardiomyopathien ist, waren Mutationen im Myosin-Bindungsprotein C die häufigsten krankheitsverursachenden Mutationen bei Patienten mit hypertropher Kardiomyopathie. Daher sollte bei der genetischen Diagnostik von Patienten mit hypertropher Kardiomyopathie zuerst ein Screening im Myosinbindungsprotein C durchgeführt werden. Zudem sollte die Founder-Mutation IVS7+1G/A, die überdurchschnittlich häufig vorkommt, möglicherweise bevorzugt behandelt werden.

## 6. Summary

### **Genetic variabilities in the human cardiac myosin binding protein C-gene and its significance for hypertrophic cardiomyopathy**

The hypertrophic cardiomyopathy (HCM) is a primary cardiac disorder with a heterogeneous clinical and morphological expression (Ogimoto et al., 2004). A cause analysis of the HCM in 62 patients and their families from several countries achieved the following results: Mutations were predominantly identified in the genes of the MYH7 and the cardiac myosin binding protein C (MYBP-C) (Voßberg et al., 2003). In the biggest study of its kind mutations in the MYBP-C-gene were noticed in 42 % of the patients with HCM (Richard et al., 2003).

At the beginning of this thesis (1999–2001) the scientists thought that 15 % of all mutations, which cause the HCM/HOCM, occur in the MYBP-C-gene. These mutations were described with a late beginning and benign process (Maron et al., 2001). But the role and the frequency of the mutations in the MYBP-C-gene were underestimated.

In our study 80 % of the mutations, which cause HCM, were located in the MYBP-C-gene and the MYH7-gene (Erdmann et al., 2003). The most mutations were found in the MYBP-C-gene (18.5 %) with a broad spectrum of mutation types. At the time of diagnosis the age of the patients with protein-truncation mutations was  $34\pm 11$  years. This group had the highest rate of myectomy, TASH and ICD ( $p < 0.05$ ) (Erdmann et al., 2003). Invasive procedures were made in over 60 % of the patients without protein truncating mutations.

In the context of this work a systematic mutation screening was made for the first time in a large patient collective of unrelated patients. Previous studies analysed the frequency of the mutations, which mainly based on family studies. The aim of this study was to determine the mutation type and his frequency in a large unrelated patient collective.

The mutation screening was carried out by means of PCR-SSCP-analysis. Altogether 106 unrelated patients with HCM or HOCM were examined after mutations in MYBP-C-gene (Exon 6 to 21) from 1999 to 2001. Most of these patients were treated in the German Heart

Centre in Berlin (DHZB). The patient collective consisted of 106 unrelated patients (68 male and 38 female patients) at the age of 12–82 years. The average age was 53.2 years. The age at the time of diagnosis was  $45.5 \pm 14$  years. Nine of 106 patients were of Turkish descent, all the other patients of German origin. To exclude other causes of hypertrophy the patients were diagnosed under international rules (Maron, McKenna et al., 2003): 24 h-ECG, echocardiography and angiography. Independent of echocardiography criteria patients in whom a myectomy had already been made were also included in the study.

The variants found were identified by sequence analysis and following RFLP. Eleven mutations were defined and the associated phenotypes found. If possible the family member of the mutation carrier were also examined. The proved mutations are the following five amino acid substitutions (E258K, R282W, G507R, G523W, C566R), two splice mutations (IVS7+1G/A, IVS20-2A/G), two deletions (DelC343, DelC390) and two sequence variants with unknown pathogenesis (IVS9-36G/A, IVS17+11C/G). It was noticed that the deletions and splice mutations mentioned above most likely cause shortened MYBP-C molecules. The splice mutation IVS7+1G/A was noticed only on two patients. With the help of a haplotyp analysis we have managed to notice also that the splice mutation IVS7+1G/A is a founder mutation. The splice mutation IVS7+1G/A is the first founder mutation in a European population, which was found the first time in our study (Erdmann et al., 2003).

In addition to mutations responsible for the HCM, the following seven polymorphisms were found: S236G, T262T, R326Q, IVS12-24C/T, IVS13+29G/A, IVS19+47G/A, IVS21+38A/T. These variants were also stated on the healthy control collective. Only the variants E258K, G507R, S236G and R326Q were already reported by other working groups. All the variants who were found so far were published by Erdmann et al. (2001 und 2003).

In the patient collective of the DHZB, which treats patients with cardiomyopathy, the mutations in the myosin binding protein C were the most frequent cause of disease of hypertrophy cardiomyopathy. Therefore at the genetic diagnostics of patients with hypertrophy cardiomyopathy should at first a screening be carried out in the myosin binding protein - C. Moreover because the founder mutation IVS7+1G/A is frequent above-average, it should be perhaps treated preferentially.

## 7. Abkürzungen

A	Adenin
Abb.	Abbildung
ACTC	Actin
ADRBK2	$\beta$ -adrenergic Rezeptor kinase 2
Ala	Alanin
FS	fractional shorting;
AF	atrial Fibrillation;
AP	angina pectoris;
APS	Ammoniumpersulfat
Aqua dest.	Aqua destillata
Arg	Arginin
As	Aminosäure
Asn	Asparagin
Asp	Asparaginsäure
Bp (Bp)	Basenpaare
C	Cytosin
cAMP	cyclisches Adenosin-5'-Monophosphat
CAV3	Caveolin - 3
cDNA	copy DNA
(CW)-Doppler	Continuous-Wave-Doppler
Cys	Cystein
dATP	Desoxyadenosin-5'-Triphosphat
dCTP	Desoxycytidin-5'-Triphosphat
ddNTPs	Didesoxynukleosidtriphosphate
DCM	dilatative Kardiomyopathie
del	Deletion
DHZB	Das Deutsche Herzzentrum Berlin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphate
dTTP	Desoxythymidin-5'Triphosphat

EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FnIII	Fibronectin Typ III
FS	fractional shortening (%)
G	Guanin
Gln	Glutamin
Glu	Glutaminsäure
Gly	Glycin
HCM	hypertrophe Kardiomyopathie
His	Histidin
HOCM	hypertrophe obstruktive Kardiomyopathie
ICD	implantierbarer kardioverter-Defibrillator
IgI	Immunglobulin Klasse-I
Ile	Isoleucin
IVS	“Intervening sequence” Intron
	interventricular septum (Echokardiographie)
KCNQ4	K voltage-gated channel
LAEDD	linksatrialer enddiastolischer Durchmesser
LAMP2	Lysosome - associated membrane protein
LVEDD	linksventrikulärer enddiastolischer Durchmesser
LVEDP	left ventricular enddiastolic pressure
LVEDVI	left ventricular enddiastolic volume index
LVEF	linksventrikuläre Ejektionsfraktion
Leu	Leucin
Lys	Lysin
Met	Methionin
MHY7	$\beta$ -Myosin Schwereketten
MLCK	Myosin light chain Kinase 2
MLP	Muskel LIM Protein
mRNA	messenger RNA, Boten RNA
MYBP-C	Myosin -bindendes Protein C
MYH6	$\alpha$ -Myosin – Schwereketten
MHY7	$\beta$ -Myosin – Schwereketten
MYL3	Essentielle Myosin – Leichtketten

MYL2	Regulatorische Myosin – Leichtkette
n	Anzahl
nda	no data available
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
N-Terminus	Aminoterminus
PAA-Gel	Polyacrylamidgel
PCR	Polymerase Kettenreaktion
Phe	Phenylalanin
PRKAG2	AMP- Aktivierende Proteinkinase
Pro	Prolin
PW	posterior wall
RFLP	Restriktionsfragmentlängen-Polymorphismus
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transcriptase PCR
SAM	systolic anterior movement
SDS	Natriumdodecylsulfat
Ser	Serin
SSCP	single strand conformation polymorphism
T	Thymin
Tab.	Tabelle
Tag	Thermus aquaticus
TASH	transcoronary ablation of septal hypertrophy
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TCAP	Telethonin
TDI	tissue Doppler imaging
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Thr	Threonin
TNNC1	Troponin C
TNNI3	Troponin I
TNNT2	Troponin T
TPM1	$\alpha$ -Tropomyosin
Tris	Trishydroxymethylaminomethan



Trp	Tryptophan
TTN	Titin
Tyr	Tyrosin
U	„unit“, Einheit
UV-Licht	ultraviolettes Licht
Val	Valin
WT	Wildtyp
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter

## **8. Danksagung**

Frau Prof. Dr. Regitz-Zagrosek danke ich für die Überlassung des Forschungsthemas, die freundliche Unterstützung und die wissenschaftliche Beratung bei der Durchführung der Arbeit. Mein besonderer Dank gilt Frau PD Dr. Erdmann, die mir stets hilfreich zur Seite stand und auf alle inhaltlichen und methodischen Fragen antworten konnte.

Den Laboralltag bewältigte ich durch die unermüdliche Unterstützung von Frau Kallisch. Ich bedanke mich auch für die Durchführung der DNA-Sequenzierung.

Mein weiterer Dank gilt den Mitarbeitern und Doktoranden der Arbeitsgruppe für ihre Hilfsbereitschaft sowie die freundliche und angenehme Atmosphäre, in der ich diese Arbeit anfertigen konnte.

Schließlich bedanke mich bei Frau Dr. Liptau sowie Herrn Frank Schabel für die Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit.

## **9. Anhang**

### **9.1 Erklärung**

„Ich, Jaleh, Maki Abadi, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: Mutationsanalyse im MYBP-C-Gen bei Patienten mit hypertropher Kardiomyopathie, selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die unzulässige Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.

## 9.2 Tabellarischer Überblick über die Genotypen

**Tab. 22:** Die Genotypen-Analyse von allen HCM-Patienten für sämtliche Polymorphismen (11=Homozygot für WT, 12=Heterozygot für Variante, 22=Homozygot für Variante).

Nr.	DNA.	S236G	T262T	IVS13+29G>A	IVS12-24C>T	R326Q	IVS21+38A>T	IVS19+47G>A
1	3	12	12	12	11	11	11	11
2	4	12	12	12	11	11	11	11
3	6	11	11	11	11	11	11	11
4	7	12	12	12	11	11	11	11
5	8	11	11	11	11	11	11	11
6	9	11	11	11	11	11	11	11
7	10	11	11	11	11	11	11	11
8	11	11	11	11	12	11	11	11
9	13	11	11	11	12	11	11	11
10	14	11	11	11	12	11	11	11
11	15	11	11	11	11	11	11	11
12	18	11	11	11	12	11	11	11
13	20	11	11	11	12	11	11	11
14	22	12	12	12	12	11	11	11
15	25	11	11	11	12	11	11	11
16	27	12	11	12	11	11	11	11
17	28	11	11	11	11	11	11	11
18	29	22	22	22	11	11	11	11
19	33	12	11	12	11	11	11	11
20	34	12	12	12	11	11	11	11
21	35	11	11	11	12	11	11	11
22	37	11	11	11	12	11	11	11
23	39	11	11	11	12	12	12	11
24	40	11	11	11	12	11	11	11
25	42	11	11	11	12	11	11	11
26	43	11	11	11	12	11	11	11
27	45	11	11	11	12	12	12	11

Nr.	DNA.	S236G	T262T	IVS13+29G>A	IVS12-24C>T	R326Q	IVS21+38A>T	IVS19+47G>A
28	46	11	12	12	12	11	11	11
29	52	11	12	12	12	11	11	11
30	53	12	12	12	11	11	11	11
31	64	11	11	11	11	11	11	11
32	65	11	11	11	11	11	11	11
33	70	11	11	11	12	11	11	12
34	71	11	11	11	12	11	11	11
35	81	11	11	11	12	11	11	11
36	90	11	11	11	12	11	11	11
37	95	11	11	11	11	11	11	11
38	100	11	11	11	11	11	11	11
39	104	11	11	11	11	11	11	11
40	115	11	11	11	22	11	11	12
41	139	11	11	11	11	11	11	11
42	150	12	12	12	11	11	11	11
43	153	12	12	12	12	11	11	11
44	154	11	11	11	11	11	11	11
45	164	11	11	11	12	11	11	11
46	169	12	12	12	11	11	11	11
47	188	11	11	11	11	11	11	11
48	205	11	11	11	12	11	11	11
49	314	11	11	11	11	11	11	11
50	315	11	11	11	11	12	12	11
51	340	12	11	11	12	11	11	11
52	343	11	11	11	12	11	11	11
53	370	11	11	11	12	11	11	11
54	430	11	11	11	12	11	11	11
55	456	11	11	11	11	11	11	11
56	496	11	11	11	12	11	11	12
57	556	11	11	11	11	11	11	11
58	885	11	11	11	22	11	11	11
59	901	11	11	11	11	11	11	11

Nr.	DNA.	S236G	T262T	IVS13+29G>A	IVS12-4C>T	R326Q	IVS21+38A>T	IVS19+47G>A
60	928	11	11	11	11	12	12	11
61	945	12	12	12	11	11	11	11
62	954	11	11	11	11	11	11	11
63	955	11	11	11	22	11	11	11
64	966	11	11	11	11	11	11	11
65	973	12	11	11	11	11	11	11
66	1071	11	11	11	11	11	11	11
67	1093	11	11	11	22	11	11	12
68	1119	11	11	11	12	11	11	11
69	1141	11	11	11	12	11	11	11
70	1147	12	12	12	11	11	11	11
71	1148	11	11	11	12	11	11	11
72	1156	11	11	11	12	11	11	11
73	1159	11	11	11	11	11	11	11
74	1161	11	11	11	22	11	11	11
75	1206	11	11	11	11	11	11	11
76	1221	11	11	11	22	11	11	11
77	1222	12	12	12	11	11	11	11
78	1238	12	12	12	11	11	11	11
79	1256	12	12	12	11	11	11	11
80	1274	12	12	12	12	11	11	11
81	1305	11	11	11	11	11	11	11
82	1309	11	11	11	11	11	11	11
83	1313	12	12	12	12	11	11	11
84	1325	11	11	11	11	12	12	11
85	1326	11	11	11	12	11	11	11
86	1331	12	12	12	11	11	11	11
87	1332	11	11	11	11	11	11	11
88	1377	11	11	11	11	11	11	11
89	1385	11	11	11	12	11	11	11

<b>Nr.</b>	<b>DNA.</b>	<b>S236G</b>	<b>T262T</b>	<b>IVS13+29G&gt;A</b>	<b>IVS12-24C&gt;T</b>	<b>R326Q</b>	<b>IVS21+38A&gt;T</b>	<b>IVS19+47G&gt;A</b>
90	1423	12	12	12	11	11	11	11
91	1427	11	11	11	22	11	11	12
92	1433	12	12	12	11	11	11	11
93	1502	11	11	11	22	11	11	11
94	1510	22	12	22	11	11	11	11
95	1516	11	11	11	12	11	11	11
96	1541	11	11	11	11	11	11	11
97	1553	11	11	11	11	11	11	11
98	1590	12	12	12	12	11	11	11
99	1594	11	11	11	11	11	11	11
100	1636	11	11	11	12	12	12	11
101	1643	12	12	12	11	11	11	11
102	1663	12	12	12	11	11	11	11
103	1670	12	12	12	11	11	11	11
104	1740	12	12	12	12	11	11	11
105	1791	12	12	12	12	11	11	11
106	1824	12	12	12	11	11	11	11

### 9.3 Literaturverzeichnis

1. Ackerman MJ: Genetic testing for risk stratification in hypertrophic cardiomyopathy and long QT syndrome: fact or fiction? *Current Opinion in Cardiology* 2005; 20:175-181.
2. Alders M, Jongbloed R, Deelen W, van den Wijngaard A, Doevendans P, Ten Cate F, Regitz-Zagrosek V, Vosberg HP, van Langen I, Wilde A, Dooijes D, Mannens M: The 2373insG mutation in the MYBP-C gene is a founder mutation, which accounts for nearly one-fourth of the HCM cases in the Netherlands. *Eur Heart J* 2003; 24(20):1848-53.
3. Andersen PS, Havndrup O, Bundgaard H, Larsen LA, Vuust J, Pedersen AK, Kjeldsen K, Christiansen M: Genetic and phenotypic characterization of mutations in myosin-binding protein C (MYBP-C) in 81 families with familial hypertrophic cardiomyopathy: total or partial haploinsufficiency. *Eur J Hum Genet* 2004; 12(8):673-7.
4. Bennett P, Craig R, Starr R, Offer G: The ultrastructural location of C-protein, X-protein and H-protein in rabbit muscle. *J Muscle Res Cell Motil* 1986; 7(6):550-67.
5. Carrier L, Hengstenberg C, Beckmann JS et al: Mapping of a novel gene for familial hypertrophic cardiomyopathy to chromosome 11. *Nat Genet* 1993; 4(3):311-3.
6. Carrier L, Bonne G, Bahrend E, Yu B, Richard P, Niel F, Hainque B, Cruaud C, Gary F, Labeit S, Bouhour JB, Dubourg O, Desnos M, Hagege AA, Trent RJ, Komajda M, Fiszman M, Schwartz K: Organization and sequence of human cardiac myosin binding protein C gene (MYBP-C) and identification of mutations predicted to produce truncated proteins in familial hypertrophic cardiomyopathy. *Circ Res* 1997; 80(3):427-34.
7. Chien, KR: Genomic circuits and the integrative biology of cardiac diseases. *Nature* 2000; 40(6801), 227-232.
8. Cichon S, Freudenberg J, Propping P, Nöthen MM: Variabilität im menschlichen Genom. *Medizin* 2002; Heft 46.



9. Craig R, Offer G: The location of C-protein in rabbit skeletal muscle. *Proc R Soc Lond [Biol]* 1976; 192(1109):451-61.
10. Cooper DN, Schmidtke J: DNA restriction fragment length polymorphisms and heterozygosity in the human genome. *Hum Genet* 1984; 66(1):1-16.
11. Daehmlow S, Erdmann J, Knueppel T, et al: Novel mutations in sarcomeric protein genes in dilated cardiomyopathy. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 298(1):116-20.
12. Den Dunnen JT, Antonarakis SE: Nomenclature for the description of human sequence variations. *Hum Genet* 2001; 109(1):121-4.
13. Erdmann J, Raible J, Maki-Abadi J, Hummel M, Hammann J, Wollnik B, Frantz E, Fleck E, Hetzer R, Regitz-Zagrosek V: Spectrum of clinical phenotypes and gene variants in cardiac myosin-binding protein C mutation carriers with hypertrophic cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 2001; 38(2):322-30.
14. Erdmann J, Daehmlow S, Wischke S, Senyuva M, Werner U, Raible J, Tanis N, Dyachenko S, Hummel M, Hetzer R, Regitz-Zagrosek V: Mutation spectrum in a large cohort of unrelated consecutive patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Clin Genet* 2003; 64(4):339-49.
15. Flashman E, Redwood C, Moolman-Smook J, Watkins H: Cardiac myosin binding protein-C: its rolls in physiology and disease, *Circ Res* 2004; 94(10):1279-89.
16. Flavigny J, Souchet M, Sebillon P, Berrebi-Bertrand I, Hainque B, Mallet A, Bril A, Schwartz K, Carrier L: COOH-terminal truncated cardiac myosin-binding protein C mutants resulting from familial hypertrophic cardiomyopathy mutations exhibit altered expression and/or incorporation in fetal rat cardiomyocytes. *J Mol Biol* 1999; 294(2):443-56.
17. Flavigny J, Robert P, Camelin JC, Schwartz K, Carrier L, Berrebi-Bertrand I: Biomolecular interactions between human recombinant beta-MyHC and cMYBP-Cs implicated in familial hypertrophic cardiomyopathy. *Cardiovasc Res* 2003; 60(2):388-96.

- 18.** Freiburg A, Gautel M: A molecular map of the interactions between titin and myosin-binding protein C. Implications for sarcomeric assembly in familial hypertrophic cardiomyopathy. *Eur J Biochem* 1996; 235(1-2):317-23.
- 19.** Gautel M, Zuffardi O, Freiburg A, Labeit S: Phosphorylation switches specific for the cardiac isoform of myosin binding protein-C: a modulator of cardiac contraction? *EMBO J* 1995; 14(9):1952-60.
- 20.** Gietzen FH, Schümmelfeder J, Neuser H, Brunn J, Schumacher B, Kerber S: Hypertrophische Kardiomyopathie, Myektomie, Schrittmacher, TASC oder ICD. *Herz* 2005; 30:102-10.
- 21.** Gilbert R, Kelly MG, Mikawa T, Fischman DA. The carboxyl terminus of myosin binding protein C (MyBP-C, C-protein) specifies incorporation into the A-band of striated muscle. *J Cell Sci* 1996; 109(1):101-11.
- 22.** Gilbert R, Cohen JA, Pardo S, Basu A, Fischman DA: Identification of the A-band localization domain of myosin binding proteins C and H (MyBP-C, MyBP-H) in skeletal muscle. *J Cell Sci* 1999; 112(1):69-79.
- 23.** Grompe, M: The rapid detection of unknown mutations in nucleic acids. *Nature Genetics* 1993; 5:111-6.
- 24.** Gruen M, Prinz H, Gautel M: cAPK-phosphorylation controls the interaction of the regulatory domain of cardiac myosin binding protein C with myosin-S2 in an on-off fashion. *FEBS Lett* 1999; 453(3):254-9.
- 25.** Hartzell HC, Glass DB: Phosphorylation of purified cardiac muscle protein by purified cAMP-dependent and endogenous Ca-calmodulin-dependent protein kinases: *J Biol Chem* 1984; 259(24):15587-96.
- 26.** Hartzell HC, Sale WS. Structure of C protein purified from cardiac muscle: *J Cell Biol* 1985; 100(1):208-15.

27. Hayashi K, Yandell DW: How sensitive is PCR-SSCP? *Hum Mutat* 1993; 2(5):338-46.
28. Hayashi T, Arimura T, Itoh-Satoh M, Ueda K et al: Tcap gene mutations in hypertrophic cardiomyopathy and dilated cardiomyopathy. *J Amer Coll Cardiol* 2004; 44(11):2192-2201.
29. Hennig, Wolfgang: *Genetik*. Springer Verlag, 1998.
30. Hofmann PA, Hartzell HC, Moss RL: Alterations in Ca<sup>2+</sup> sensitive tension due to partial extraction of C-protein from rat skinned cardiac myocytes and rabbit skeletal muscle. *J Gen Physiol* 1991; 97:1141-63.
31. Hofmann PA, Greaser ML, Moss RL: C-Protein limits shortening velocity of rabbit skeletal muscle fibres at low levels of Ca<sup>2+</sup> activation. *J Physiol* 1991; 439:701-15.
32. Hoshijima M, Chien KR: Mixed signals in heart failure: Cancer rules. *J Clin Invest* 2002; 109(7):849-55.
33. Idowu SM, Gautel M, Perkins SJ, Pfuhl M: Structure, stability and dynamics of the central domain of cardiac myosin binding protein C (MYBP-C): implications for multidomain assembly and causes for cardiomyopathy. *J Mol Biol* 2003; 329(4):745-61.
34. Jaaskelainen P, Kuusisto J, Miettinen R, Karkkainen P, Karkkainen S, Heikkinen S, Peltola P, Pihlajamaki J, Vauhkonen I, Laakso M: Mutations in the cardiac myosin-binding protein C gene are the predominant cause of familial hypertrophic cardiomyopathy in eastern Finland. *J Mol Med* 2002; 80(7):412-22.
35. Korte FS, McDonald KS, Harris SP, Moss RL: Loaded shortening, power output, and rate of force redevelopment are increased with knockout of cardiac myosin binding protein-C. *Circ Res* 2003; 93(8):752-8.
36. Dagmar Keller, Stefan Osswald, Marijke Brink: Familiäre hypertrophe Kardiomyopathie: Genetik und molekulare Mechanismen. Departement Klinisch-Biologische Wissenschaften DKBW, Universitätsspital Basel, *Schweiz Med Forum* 2005;5:90-93

- 37.** Kulikovskaya I, McClellan G, Flavigny J, Carrier L, Winegrad S: Effect of MYBP-C binding to actin on contractility in heart muscle. *J Gen Physiol* 2003; 122(6):761-74.
- 38.** Kunst G, Kress KR, Gruen M, Uttenweiler D, Gautel M, Fink RH: Myosin binding protein C, a phosphorylation-dependent force regulator in muscle that controls the attachment of myosin heads by its interaction with myosin S2. *Circ Res* 2000; 86:51-58.
- 39.** Marian AJ: On genetic and phenotypic variability of hypertrophic cardiomyopathy: nature versus nurture. *J Am Coll Cardiol* 2001; 38(2):331-4. Erratum in: *J Am Coll Cardiol* 2001; 38(4):1275.
- 40.** Marian AJ, Roberts, R: The molecular genetic basis for hypertrophic cardiomyopathy. *J Mol Cell Cardiol* 2001; 33:655-70.
- 41.** Maron BJ, Gardin JM, Flack JM, Gidding SS, Kurosaki TT, Bild DE: Prevalence of hypertrophic cardiomyopathy in a general population of young adults. Echocardiographic analysis of 4111 subjects in the CARDIA study. *Coronary Artery Risk Development in (Young) Adults. Circulation* 1995; 92(4):785-9.
- 42.** Maron BJ: Triggers for sudden cardiac death in the athlete. *Cardiol Clin* 1996; 14(2):195-210.
- 43.** Maron BJ, Strasburger JF, Kugler JD, Bell BM, Brodkey FD, Poliac LC., Survival following blunt chest impact-induced cardiac arrest during sports activities in young athletes. *Am J Cardiol.* 1997 Mar 15; 79 (6): 840-1
- 44.** Maron BJ, Niimura H, Casey SA, Soper MK, Wright GB, Seidman JG, Seidman CE: Development of left ventricular hypertrophy in adults in hypertrophic cardiomyopathy caused by cardiac myosin-binding protein C gene mutations. *J Am Coll Cardiol* 2001; 38(2):315-21.
- 45.** Maron BJ. : "The young competitive athlete with cardiovascular abnormalities: causes of sudden death, detection by preparticipation screening, and standards for disqualification. *Card Electrophysiol Rev.* 2002 Feb; 6 (1-2):100-3

- 46.** Maron BJ, Carney KP, Lever HM, Lewis JF, Barac I, Casey SA, Sherrid MV.: Relationship of race to sudden cardiac death in competitive athletes with hypertrophic cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol.* 2003 Mar 19; 41 (6): 974-80.
- 47.** Maron BJ (ed.): *Diagnosis and management of hypertrophic cardiomyopathy.* Massachusetts: Blackwell Futura, 2004.
- 48.** McClellan G, Kulikovskaya I, Winegrad S: Changes in cardiac contractility related to calcium-mediated changes in phosphorylation of myosin-binding protein C. *Biophys J* 2001; 81:1083-92.
- 49.** Miller SA, Dykes DD, Polesky HF: A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1988; 16(3):1215.
- 50.** Miura K, Nakagawa H, Morikawa Y et al: Epidemiology of idiopathic cardiomyopathy in Japan: results from a nationwide survey. *Heart* 2002; 87(2):126-30.
- 51.** Miyamoto CA, Fischman DA, Reinach FC: The interface between MYBP-C and myosin: site-directed mutagenesis of the CX myosin-binding domain of MYBP-C. *J Muscle Res Cell Motil* 1999; 20(7):703-15.
- 52.** Moolman-Smook JC, De Lange WJ, Bruwer EC, Brink PA, Corfield VA: The origins of hypertrophic cardiomyopathy-causing mutations in two South African subpopulations: a unique profile of both independent and founder events. *Am J Hum Genet* 1999; 65(5):1308-20.
- 53.** Moolman JA, Reith S, Uhl K, Bailey S, Gautel M, Jeschke B, Fischer C, Ochs J, McKenna WJ, Klues H, Vosberg HP: A newly created splice donor site in exon 25 of the MYBP-C gene is responsible for inherited hypertrophic cardiomyopathy with incomplete disease penetrance. *Circulation* 2000; 101(12):1396-402.

- 54.** Moolman-Smook JC, Flashman E, de Lange W, et al: Identification of novel interactions between domains of Myosin binding protein-C that are modulated by hypertrophic cardiomyopathy missense mutations. *Circ Res* 2002; 91(8):704-11.
- 55.** Morner S, Richard P, Kazzam E, Hellman U, Hainque B, Schwartz K, Waldenstrom A: Identification of the genotypes causing hypertrophic cardiomyopathy in northern Sweden. *J Mol Cell Cardiol* 2003; 35(7):841-9.
- 56.** Mullis KB, Faloona FA: Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalysed chain reaction reaction. *Methods Enzymol* 1987; 155:335-50.
- 57.** Nagueh SF, McFalls J, Meyer D, Hill R, Zoghbi WA, Tam JW, Quinones MA, Roberts R, Marian AJ: Tissue Doppler imaging predicts the development of hypertrophic cardiomyopathy in subjects with subclinical disease. *Circulation* 2003; 108(4):395-8.
- 58.** Nanni L, Pieroni M, Chimenti C, Simionati B, Zimbello R, Maseri A, Frustaci A, Lanfranchi G: Hypertrophic cardiomyopathy: two homozygous cases with "typical" hypertrophic cardiomyopathy and three new mutations in cases with progression to dilated cardiomyopathy. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 309(2):391-8.
- 59.** Niimura H, Bachinski LL, Sangwatanaroj S, Watkins H, Chudley AE, McKenna W, Kristinsson A, Roberts R, Sole M, Maron BJ, Seidman JG, Seidman CE: Mutations in the gene for cardiac myosin-binding protein C and late-onset familial hypertrophic cardiomyopathy. *N Engl J Med* 1998; 338(18):1248-57.
- 60.** Niimura H, Patton KK, McKenna WJ, Soultis J, Maron BJ, Seidman JG, Seidman CE: Sarcomere protein gene mutations in hypertrophic cardiomyopathy of the elderly. *Circulation* 2002; 105(4):446-51.
- 61.** Oakley CE, Hambly BD, Curmi PM, Brown LJ: Myosin binding protein C: Structural abnormalities in familial hypertrophic cardiomyopathy. *Cell Res* 2004; 14(2):95-110.

- 62.** Ogimoto A, Hamada M, Nakura J, Shigematsu Y, Hara Y, Ohtsuka T, Morishima A, Kimura A, Miki T, Hiwada K: 17-year follow-up study of a patient with obstructive hypertrophic cardiomyopathy with a deletion mutation in the cardiac myosin binding protein C gene. *Circ J* 2004; 68(2):174-7.
- 63.** Okagaki T, Weber FE, Fischman DA, Vaughan KT, Mikawa T, Reinach FC: The major myosin-binding domain of skeletal muscle MyBP-C (C-protein) resides in the COOH-terminal, immunoglobulin C2 motif. *J Cell Biol* 1993; 123:619-26.
- 64.** Orita M, Iwahana H, Kanazawa H, Hayashi K, Sehiya T: Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86(8):2766-70.
- 65.** Richard P, Charron P, Carrier L, Ledeuil C, Cheav T, Pichereau C, Benaiche A, Isnard R, Dubourg O, Burban M, Gueffet JP, Millaire A, Desnos M, Schwartz K, Hainque B, Komajda M: EUROGENE Heart Failure Project. Hypertrophic cardiomyopathy: distribution of disease genes, spectrum of mutations, and implications for a molecular diagnosis strategy. *Circulation* 2003; 107(17):2227-32.
- 66.** Rottbauer W, Gautel M, Zehelein J, et al: Novel splice donor site mutation in the cardiac myosin-binding protein-C gene in familial hypertrophic cardiomyopathy. Characterization of cardiac transcript and protein. *J Clin Invest* 1997; 100(2):475-82.
- 67.** Sanger F, Nicklen S, Coulson AR: DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977; 74(12):5463-5467.
- 68.** Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Sharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Ehrlich HA: Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 1988; 239(4839):487-91.
- 69.** Sarikas A, Carrier L, Schenke C, Doll D, Flavigny J, Lindenberg KS, Eschenhagen T, Zolk O: Impairment of the ubiquitin-proteasome system by truncated cardiac myosin binding protein C mutants. *Cardiovasc Res* 2005; 66(1):33-44.

- 70.** Seidman CE, Seidman JG: Molecular genetic studies of familial hypertrophic cardiomyopathy. *Basic Res Cardiol* 1998; 93:13-6.
- 71.** Scheffold T, Binner P, Erdmann J, Schunkert H: Hypertrophe Kardiomyopathie. *Herz* 2005; 30:550-7.
- 72.** Squire JM, Luther PK, Knupp C. Structural evidence for the interaction of C-protein (MYBP-C) with actin and sequence identification of a possible actin-binding domain: *J Mol Biol* 2003; 331(3):713-24.
- 73.** Starr R, Offer G: Polypeptide chains of intermediate molecular weight in myosin preparations. *FEBS Lett* 1971; 15(1):40-4.
- 74.** Starr R, Offer G: The interaction of C-protein with heavy meromyosin and subfragment-2. *Biochem J* 1978; 171(3):813-6.
- 75.** Swan RC, Fischman DA: Electron microscopy of C-protein molecules from chicken skeletal muscle. *J Muscle Res Cell Motil* 1986; 7(2):160-6.
- 76.** Van Driest SL, Vasile VC, Ommen SR, Will ML, Tajik AJ, Gersh BJ, Ackerman MJ: Myosin binding protein C mutations and compound heterozygosity in hypertrophic cardiomyopathy. *J Amer Coll Cardiol* 2004; 44:1903-10.
- 77.** Vikstrom KL, Leinwand LA: Related Articles, Contractile protein mutations and heart disease. *Curr Opin Cell Biol* 1996; 8(1):97-105.
- 78.** Vosberg HP: Die genetischen Ursachen der hypertrophischen Kardiomyopathie. *Medizinische Klinik* 1998; 93(4):252-9.
- 79.** Vosberg HP: Ursachen und pathogenetische Mechanismen der hypertrophen Kardiomyopathie. Max-Planck-Institut für physiologische und klinische Forschung, 2003.
- 80.** Wang P, Zou Y, Fu C, Zhou X, Hui R: MYBP-C polymorphism is a modifier for expression of cardiac hypertrophy in patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 329(2):796-9.



- 81.** Watking H, Rosenzweig A, Hawang D, Levi T, McKenna W, Seidman CE, Seidman JG: Characteristics and prognostic implications of myosin missense mutations in familial hypertrophic cardiomyopathy: *N Engl J Med* 1992; 326:1108-14.
- 82.** Winegrad S: Cardiac myosin binding protein C. *Circ Res* 1999; 84(10):1117-26.
- 83.** Witt CC, Gerull B, Davies MJ, Centner T, Linke WA, Thierfelder L: Hypercontractile properties of cardiac muscle fibers in a knock-in mouse model of cardiac myosin-binding protein-C. *J Biol Chem* 2001; 276(7):5353-9.
- 84.** Yamamoto K, Moos C: The C-proteins of rabbit red, white, and cardiac muscles. *J Biol Chem* 1983; 258(13):8395-401.
- 85.** Yang Q, Sanbe A, Osinska H, Hewett TE, Klevitsky R, Robbins J: A mouse model of myosin binding protein C human familial hypertrophic cardiomyopathy. *J Clin Invest* 1998; 102:1292–1300.