

Experimental & Clinical Research Center (ECRC)
am Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Die Bedeutung von Mutationen im Desmin-Gen bei der
Pathogenese von Hypertropher Kardiomyopathie und
Non-Compaction Kardiomyopathie

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité - Universitätsmedizin Berlin

von

Nadja Eckert

aus Bad Friedrichshall

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

Datum der Promotion: 25.10.2013

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....III

Abkürzungsverzeichnis.....VI

1. Einleitung.....1

1.1 Kardiomyopathien und ihre Klassifikation

1.2 Die hypertrophe Kardiomyopathie

1.2.1 Symptome

1.2.2 Diagnostik

1.2.3 Therapie

1.2.4 Genetik

1.3 Die Non-Compaction Kardiomyopathie

1.3.1 Symptome

1.3.2 Diagnostik

1.3.3 Therapie

1.3.4 Genetik

1.4 Desmin

1.4.1 Eigenschaften und Aufbau

1.4.2 Vorkommen und Funktion

1.4.3 Assoziierte Erkrankungen

1.5 Zielsetzung der Arbeit

2. Methoden und Materialien.....17

2.1 Patientenkollektiv

2.2 DNA-Extraktion

2.3 Polymease-Chain-Reaktion (PCR)

2.3.1 Primer-Design

2.3.2 PCR-Optimierung

2.3.3 PCR-Durchführung

2.3.4 Agarosegelelektrophorese

2.4 Sequenzierung	
2.4.1 Enzymatische Aufreinigung	
2.4.2 Herstellung der Sephadex-Platte	
2.4.2 Durchführung der Sequenzieru	
2.4.3 Auswertung	
2.5 Übersicht über alle verwendeten Materialien	
2.5.1 Chemikalien	
2.5.2 Geräte	
2.5.3 Verbrauchsmaterialien	
3. Ergebnisse.....	29
3.1 PCR-Optimierung	
3.2 Auswertung der Sequenzierungen der Patienten	
3.3 Familie A	
3.4 Überblick über die Ergebnisse	
3.5.1 HCM-Patienten	
3.5.2 NC-Patienten	
3.5.3 Tabellarische Zusammenfassung	
4. Diskussion.....	40
4.1 Überblick	
4.2 Methoden	
4.3 Prävalenz der Varianten	
4.3.1 sSNPs	
4.3.1 nsSNP	
4.4 Familie A	
4.5 Phänotypische Auswirkung von Desmin-Mutationen	
4.6 Konservierung	
4.7 Bedeutung der Desmin-Mutation in der Pathogenese	
4.8 Weiterführende Untersuchungen	
5. Zusammenfassung.....	50

6. Literaturverzeichnis.....	53
Danksagung.....	55
Lebenslauf.....	56
Selbstständigkeitserklärung.....	57

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
AA	Aminosäure
ACE-Hemmer	Angiotensin Converting Enzyme Hemmer
AHA	American Heart Association
Ala	Alanin
ARVC	arrhythmogene rechtsventrikuläre Kardiomyopathie
Asp	Asparaginsäure
AV-Block	atrioventrikulärer Block
Bp	Basenpaare
C	Cytosin
cDNA	komplementäre DNA
CK	Creatin Kinase
CM	Kardiomyopathie
cw-Doppler	continuous-wave Doppler
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
DCM	dilatative Kardiomyopathie
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
ddNTP	Didesoxynukleotidbase
DES	Desmin
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
dH ₂ O	destilliertes Wasser
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DRM	Desmin related Myopathie
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
E. coli	Escherichia coli
EKG	Elektrokardiogramm
ESC	European Society of Cardiology
et al.	et alii/et aliae/et alia ("und andere")
Exo I	Exonuklease I
G	Guanin
gDNA	genomische DNA
HCM	hypertrophe Kardiomyopathie
HF	Herzfrequenz
HiDi-Formamid	highly deionized formamide
HOcm	hypertrophe obstruktive Kardiomyopathie

HPLC	Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie
ICD	implantierbarer Cardioverter-Defibrillator
Ile	Isoleucin
KHK	koronare Herzkrankheit
Leu	Leucin
LVNC	left ventricular noncompaction
LVOTG	left ventricel outflow tract gradient
MgCl₂	Magnesiumchlorid
mRNA	messenger RNA
MRT	Magnet Resonanz Tomographie
NC	Non-Compaction Kardiomyopathie
NH₄	Ammonium
nsSNP	nicht-synonymer SNP
NYHA	New York Heart Association
PCR	Polymerase-Chain-Reaktion
PF	Forward Primer
PR	Reverse Primer
Pro	Prolin
RNA	Ribonukleinsäure
SAP	Shrimp Alkaline Phosphatase
Ser	Serin
SNP	Einzelnukleotid-Polymorphismus
sSNP	synonymer SNP
T	Thymin
Taq-Polymerase	Thermus aquaticus Polymerase
TASH	Transkoronare Ablation der Septum-Hypertrophie
TAZ	Taffazin-Protein
TBE-Puffer	Tris-Borat-EDTA-Puffer
Thr	Threonin
UV	Ultraviolett
V	Volt
Val	Valin
WPW-Syndrom	Wolff-Parkinson-White-Syndrom
ZASP	ZO-2 associated speckle protein

1. Einleitung

1.1 Kardiomyopathien und ihre Klassifikation

Bei Kardiomyopathien (CM) handelt es sich um sämtliche, vom Herzmuskel ausgehende Erkrankungen, welche sich in einer mechanischen und/oder elektrischen Fehlfunktion zeigen und zu schwerer Herzinsuffizienz, Arrhythmien bis hin zum Tod führen können, nicht aber um Schädigungen oder Funktionsstörungen aufgrund von beispielsweise koronaren Herzerkrankungen, Klappendefekten oder arterieller Hypertonie.

Die bedeutendsten Klassifikationsvorschläge stammen zum einen von der American Heart Association (AHA) und zum anderen von der Europäischen Gesellschaft für Kardiologie (ESC)¹.

Das zu Grunde liegende Kriterium der AHA zur Einteilung der primären CM ist die Entstehungsart. Primär bedeutet in diesem Fall, dass es sich beim Herzmuskel um das einzig oder hauptsächlich betroffene Organ handelt, während bei sekundären CM die Veränderungen des Myokards auf eine oder mehrere andere systemische Erkrankungen zurückzuführen sind.

Die Primären CM werden erneut unterteilt. Neben den genetischen und erworbenen Kardiomyopathien gibt es auch Formen, bei welchen genetische und erworbene Ursachen vorkommen. Zu diesen gemischten CM gehören die dilatative (DCM) und die restriktive (RCM), welche in 1.4.3 noch erwähnt werden. Als beispielhafte Vertreter der nicht-genetischen Formen seien hier die Myokarditis und die Tako-Tsubo-CM erwähnt². Zu den genetischen CM werden neben anderen die Hypertrophe CM (HCM) und die Non-Compaction CM (NC) gezählt, welche im Mittelpunkt dieser Arbeit stehen¹.

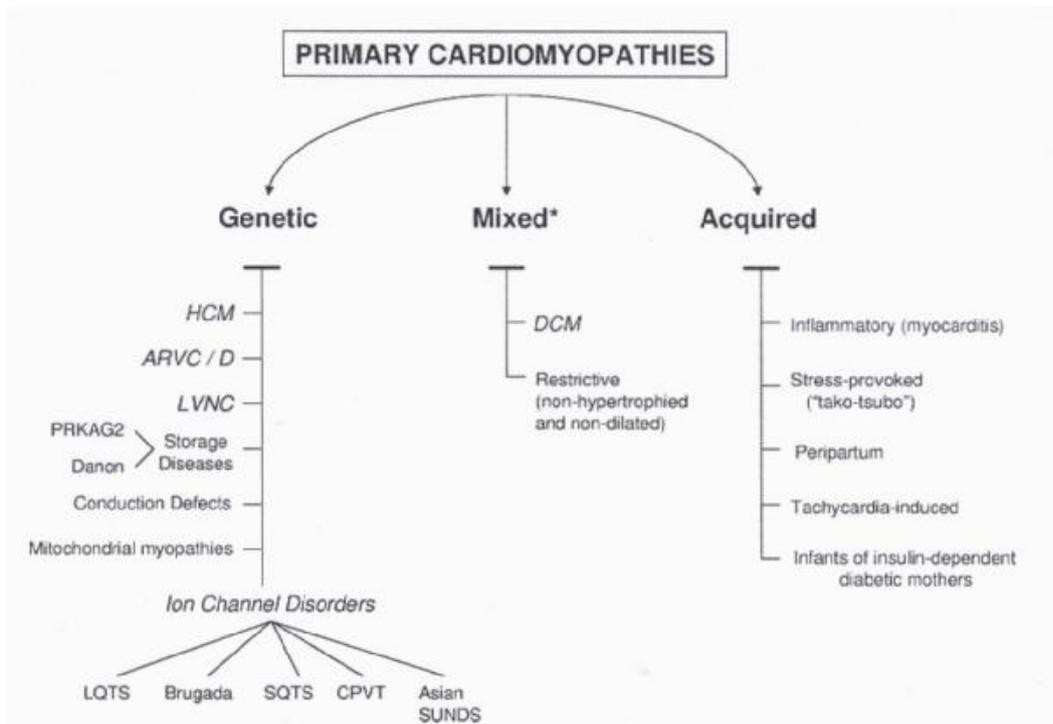


Abb. 1: Schema der AHA-Klassifikation von CM¹.

Von der ESC werden zwei Hauptgruppen unterschieden: Die familiären, also genetisch bedingten CM und die nicht-familiären, also auch nicht-genetischen. Diese werden weiter unterteilt in bekannte und bisher nicht identifizierte Gendefekte bei den familiären CM und bei den nicht-familiären in bestimmte Subgruppen und idiopathischen Formen¹.

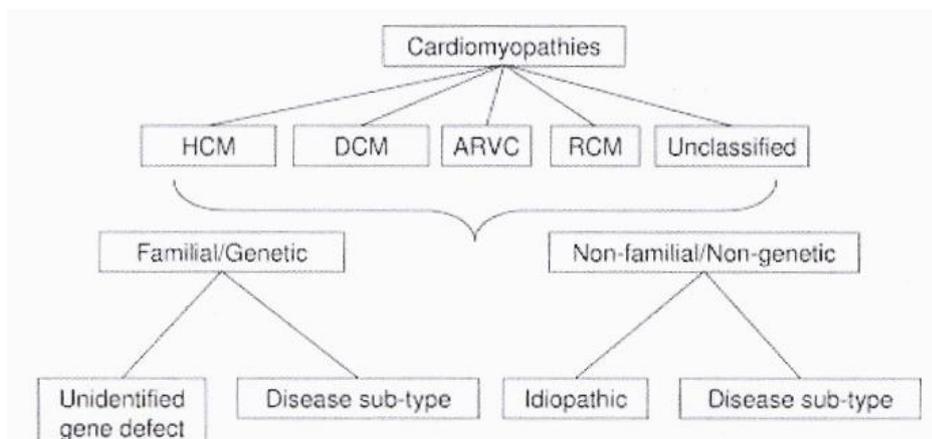


Abb. 2: Einteilung der CM nach der ESC als schematische Darstellung³.

Während die ESC die pathophysiologische Unterteilung der AHA für zu wenig praxisbezogen und eher sinnvoll für Forschungszwecke hält ⁴, verteidigt diese sich mit dem Argument, dass es lediglich zeitgerecht sei, die Genetik als Grundlage der Klassifikation zu betrachten, zumal die ESC durch die Unterscheidung in genetisch und nicht-genetisch auch nicht sonderlich von diesem Prinzip abweiche ¹. Die vom ESC vorgeschlagene morphologische bzw. funktionelle Einteilung soll eine gute Basis für die klinische Praxis sein, bietet aber Probleme bei der Einordnung von Sonderfällen wie gemischten Phänotypen, Mutationen die verschiedene Phänotypen hervorrufen können oder phänotypische Veränderungen im Laufe der Zeit ⁴.

1.2 Die hypertrophe Kardiomyopathie

Die häufigste Form der genetischen CM ist, mit einer Prävalenz von 1:500 die autosomal dominant vererbte, hypertrophe CM. Hier ist das Myokard verdickt, nicht aber der Gesamtdurchmesser des Ventrikels vergrößert, so dass das Lumen durch die hypertrophe Muskelmasse eingeengt wird und das Fassungsvermögen des Ventrikels somit verkleinert ist. Bei den meisten Patienten mit dieser Erkrankung lassen sich Wanddicken des linken Ventrikels von 20-22 mm beobachten, bei 5-10% der Erkrankten Werte sogar von 30-50 mm ².

Histologisch zeigt sich eine interstitielle Fibrose und eine Aufhebung der physiologisch ausgerichteten Anordnung der Myozyten, welche sich am ehesten als Unordnung („disarray“) bezeichnen lässt ⁵.

Im besonderen Fall befindet sich die Muskelverdickung im Bereich der Ausflussbahn, so dass diese, besonders bei starker Belastung, „verengt“ wird, weshalb man hier auch von einer hypertrophen obstruktiven CM (HOCM) spricht. Dies ist häufig der Fall bei einer asymmetrischen Septumhypertrophie. Typischerweise entwickelt sich hierbei ein Gradient zwischen linkem Ventrikel und der Ausflussbahn (left ventricel outflow tract gradient, LVOTG) der beeinflussbar ist von Kontraktilität sowie Vor- und Nachlast. Die Größe dieses Gradienten wird häufig genutzt, um dem Schweregrad einer HOCM einzuschätzen. Signifikant ist er ab einem Ruhewert von 30 mmHg ¹.

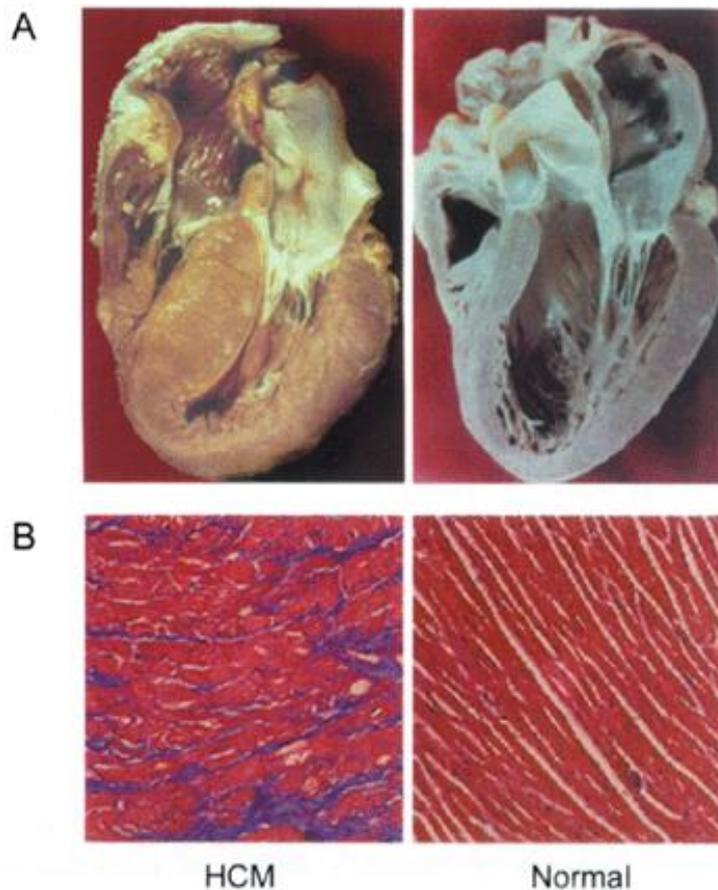


Abb.3: A- Makroskopische Gegenüberstellung der Herzen eines HCM-Patienten (links) und eines Herzgesunden (rechts). Der Schnitt durch den linken Ventrikel zeigt eine starke Verdickung des Myokards und Einengung des Ventrikellumens beim HCM-Herzens im Vergleich zum normalen Herzen.

B- Histopathologische Gegenüberstellung von Myokard eines HCM-Herzens (links) und eines normalen Herzens (rechts) mit Masson-Trichrome-Färbung. Deutliche zu erkennen ist die Fibrose und myozytäre Unordnung beim HCM-Herz ⁶.

1.2.1 Symptome

Die oben genannten anatomischen Besonderheiten ziehen eine lange Liste pathophysiologischer Erscheinungen nach sich. Es kommt zu einem Zusammenspiel von diastolischer Dysfunktion, Ischämie, systemischer Vasodilatation, Arrhythmien und, bei HOCM, LVOT-Obstruktion und – Gradient. Dementsprechend vielfältig kann sich die Erkrankung auch äußern, nämlich von Symptomfreiheit bis hin zum plötzlichen Herztod ³.

Aufgrund des geringen enddiastolischen Volumens des linken Ventrikels und der daraus resultierenden, verminderten Auswurfleistung des Herzens, leiden die Patienten mit HCM an

Atemnot und Schwindel, wobei letzteres im Vergleich zu anderen Herzerkrankungen in besonders großem Ausmaß zu Tage tritt und oftmals in einer Synkope endet. Außerdem kommt es, besonders bei Anstrengung, zu Angina pectoris, die sich durch die unzureichende Blutversorgung des hypertrophen Muskelabschnitts erklären lässt. Interessanterweise scheint für die Abschätzung des individuellen Risikos für den plötzlichen Herztod unerheblich zu sein, wie viele Risikofaktoren gleichzeitig bei Patienten vorliegen. So war in einer Studie von Maron et al. die Anzahl der adäquaten ICD-Entladungen unabhängig von der Anzahl der vorliegenden Risikofaktoren. Entscheidend ist, dass ein Risikofaktor vorliegt³.

Was jedoch die besondere Relevanz dieser Erkrankung ausmacht, ist dass es sich um die häufigste Ursache für plötzlichen Herztod in jungen Jahren, auch bei Sportlern, handelt.

Bei einer Häufigkeit von 1:500 ist die HCM die häufigste Todesursache bei Sportlern. Oftmals waren die Patienten bis dahin symptomfrei¹.

1.2.2 Diagnostik

Echokardiogramm

Der Ultraschall ist das Mittel der Wahl für die Diagnose einer HCM. Verwandte ersten Grades sollten ab dem Jugendalter alle 12-18 Monate, als Erwachsene alle 5 Jahre eine echokardiographische Screeninguntersuchung vornehmen lassen. Die pathologische Verdickung kann an sämtlichen Abschnitten des Myokards auftreten und lässt sich mittels Echokardiogramm meist sehr deutlich darstellen. Hierbei gibt es kein klassisches Erscheinungsbild, allerdings ist in den meisten Fällen das Ventrikelseptum mit betroffen. Die Ergebnisse hängen stark vom Alter des Patienten ab, obwohl, im Falle der HOCM, die linksventrikuläre Ausflussbahnobstruktion in Kombination mit einer systolischen Vorwärtsbewegung der Mitralklappe prinzipiell in jedem Alter auftreten kann. Diese Bewegung kann mittels Dopplertechnik sichtbar gemacht werden. Außerdem kann hiermit die Geschwindigkeit der Myokardkontraktion und -relaxation dargestellt werden und mit Hilfe dessen Rückschlüsse auf eine Mutation, auch bei bisherigem Ausbleiben einer Hypertrophie, gezogen werden. Per Doppler wird bei der HOCM auch die pathophysiologische Hämodynamik dargestellt. Hohe Geschwindigkeit, late-peaking, „dagger-shaped“-Signal im cw-Doppler des linksventrikulären Ausflusstrakts sind Anzeichen einer dynamischen Ausflussobstruktion. Bei Patienten mit Ausflussgeschwindigkeiten unter 3 m/s sollten physiologische Provokationen,

meist Sport, Amylnitrit-Inhalation oder Valsalva-Manöver, während der Doppler-Untersuchung unternommen werden um eine häufige latente Obstruktion festzustellen ⁸.

Elektrokardiogramm

Hierbei zeigen sich eher unspezifische Zeichen der Hypertrophie.

Neben einem positiven Sokolow-Lyon-Index, ein von der Höhe der Brustwandableitungen nach Wilson abhängiger Wert, können Repolarisationsstörungen ein Hinweis auf Hypertrophie sein. Außerdem lassen sich aus der Extremitätenableitung nach Einthoven der Lewis-Index im Falle einer Linksherzhypertrophie bzw. der Whitebock-Index bei Rechtsherzhypertrophie ermitteln ⁸.

Langzeit-EKG:

Neben supraventrikulären und ventrikulären Extrasystolen kann man im Langzeit-EKG auch oft Vorhofflimmern beobachten. Ersteres erscheint bei mehr als der Hälfte der Patienten. Auch Präexzitationssyndrom wird mit der HOCM in Verbindung gebracht und zieht meist rasch Vorhofflimmern nach sich, was eine Verschlechterung des Zustandes und eine erhöhte Gefahr für plötzlichen Herztod bedeutet ⁸.

Belastungs-EKG:

Oft wird ein spezielles ergometrisches Messverfahren, das Bruce-Protokoll, angewandt bei dem die Wattzahl und das EKG kontinuierlich überwacht wird.

In ca. einem Viertel der Fälle zeigen sich abnorme Q-Wellen, welche den fälschlichen Eindruck eines Myokardinfarktes vermitteln können. Dies hat wahrscheinlich seinen Ursprung in der Abnormität des Ventrikelseptums ⁸.

Magnet Resonanz Tomographie (MRT)

Durch die MRT bekommt man nicht nur Bilder mit besonders hoher Auflösung, sondern kann darüber hinaus auch Myokardverdickung und intramyokardiale Fibrose quantifizieren. Patienten mit ausgeprägtem „late enhancement“ als Ausdruck der Fibrose zeigten häufiger Herzrhythmusstörungen und sind daher besonders gefährdet ⁹.

1.2.3 Therapie

Die Therapie der HCM dient in erster Linie der Symptomminderung und der Risikominimierung für einen plötzlichen Herztod. Dabei gelten allgemeine Richtlinien, allerdings ist auch die individuelle Anpassung an den Patienten erfolgsbestimmend. Behandlungsrelevant ist auch die Tatsache ob eine HCM mit oder ohne Obstruktion vorliegt.

Allen HCM-Patienten sollte nahe gelegt werden auf größere sportliche Belastungen, v.a. Hochleistungssport, zu verzichten.

Die Pharmakotherapie stellt den ersten Schritt der HCM-Behandlung dar. In der Regel tragen β -Blocker und Calcium-Antagonisten zu einer guten symptomatischen Besserung bei. Sie werden, je nach Bedarf, alleine oder in Kombination gegeben. Bei der HOCM kann alternativ auch die Kombination von β -Blocker und dem negativ inotrop wirkendem Antiarrhythmikum Disopyramid gegeben werden. Im Falle einer nicht-obstruktiven HCM kann ergänzend auch eine sehr vorsichtige Senkung der Vorlast mit Hilfe von Nitraten und Diuretika vorgenommen werden. Bei persistierendem und permanentem Vorhofflimmern, sowie einer Vergrößerung des linken Vorhofs wird zusätzlich eine antikoagulative Medikation empfohlen. Den HOCM-Patienten ist außerdem eine antibiotische Prophylaxe gegen infektiöse Endokarditis nahe zu legen^{10,11}.

Abhängig von der Vorgeschichte und den Risikofaktoren ist die Empfehlung einer ICD-Implantation zur Vermeidung des plötzlichen Herztodes.

In therapierefraktären Fällen der HOCM kann chirurgisch eine Myektomie durchgeführt werden, bei welcher mittels Aortotomie Zugang zum Herzen geschaffen wird und, je nach Betroffenheit, das basale bis mittlere Ventrikelseptum entfernt wird. Eine Alternative dazu stellt die Transkoronare Ablation der Septum-Hypertrophie (TASH) dar. Bei dieser minimalinvasiven Methode wird mittels Herzkatheter 1 bis 3 ml 96 bis 98 % Ethanol in die, den entsprechenden Myokardabschnitt versorgende, Septalarterie injiziert und so in ein künstlicher Infarkt erzeugt, der zum Untergang des hypertrophen Gewebes führt. Ob die TASH sich auch zur Therapie der nicht-obstruktiver HCM eignet wird derzeit untersucht.

In beiden Fällen der HCM stellt, bei Erfolglosigkeit aller Therapieformen und fortschreitender Herzinsuffizienz, die Herztransplantation die letzte Therapieoption dar^{10,11}.

1.2.4 Genetik

Es wurden bereits über 400 Mutationen gefunden, die für die Pathogenese der HCM verantwortlich gemacht werden. Diese verteilen sich insgesamt auf über 13 Gene, welche alle für Proteine des Sarkomers oder der Sarkomer-assoziierten Strukturen kodieren.⁷ Dies kommt dadurch zustande, dass sich die Mutationen innerhalb eines Gens jeweils an verschiedenen Genloki befinden¹.

Über 70 % der Mutationen befinden sich in den Genen des β -Myosin und Myosin-bindenden Protein C. Alle bisher gefundenen Mutationen folgen einem autosomal dominanten Erbgang⁷.

Zu den übrigen bekannten, aber seltenen Mutations-Genen zählen das Muscle-LIM-Protein, Troponin T und I, Titin, α -Tropomyosin, α -Aktin, die schwere Kette des α - Myosin, und regulatorische und essentielle leichte Ketten des Myosin.

Bei ca. 50% der betroffenen Patienten konnte bislang die zugrunde liegende Mutation nicht identifiziert werden, d.h. es gibt noch unbekannte, ursächliche HCM-Gene.¹

1.3 Die Non-Compaction Kardiomyopathie

Diese spezielle CM ist gekennzeichnet durch ein überdurchschnittlich ausgebildetes, hervorstehendes Trabekelwerk, welches in erster Linie luminal in Linken Ventrikel zu finden ist, wodurch sich auch der Name left ventricular noncompaction (LVNC) durchgesetzt hat. Der Ventrikel ist außerdem zerklüftet von tiefen intertrabekulären Fortsätzen.

Das histologische Bild ist weniger spezifisch. Es findet sich fibrotisches Gewebe genauso wie Gebiete mit physiologisch angeordneten Kardiomyozyten.

Oft zeigen sich begleitend weitere Herzpathologien wie beispielsweise arterielle und ventrikuläre Septumdefekte, angeborene Aortenstenosen sowie Aortenisthmusstenosen ¹².

Nach der DCM und HCM ist die NC die dritthäufigste CM und macht 9,5% der primären CM aus ^{13,14}.

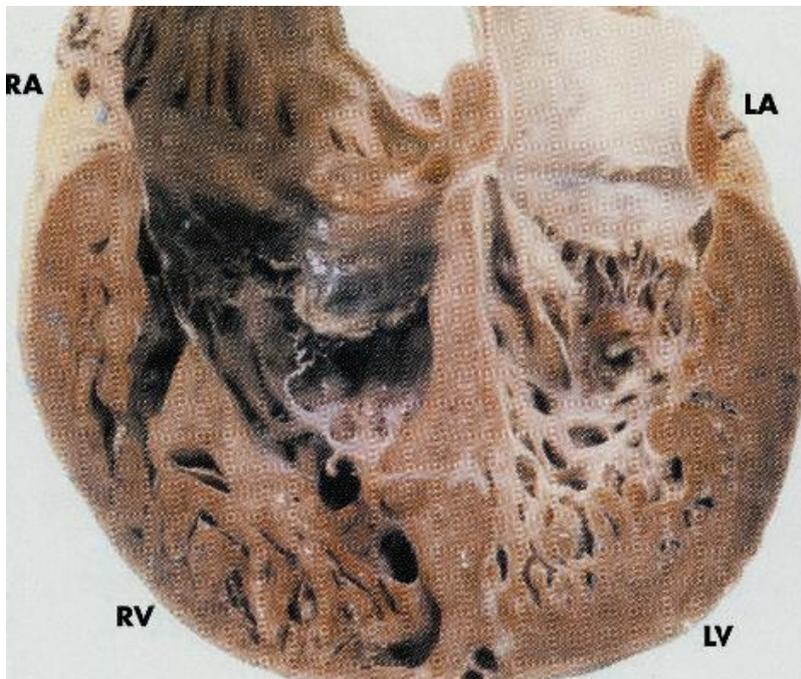


Abb. 4: Schnitt durch ein Herz mit LVNC. RA= rechter Vorhof, LA= linker Vorhof, RV= rechter Ventrikel, LV= linker Ventrikel ¹³

1.3.1 Symptome

Die klinische Symptomatik ist abhängig von der Ausbreitung des nicht kompakten Gewebes in den Herzsegmenten.

Sehr häufig findet sich, sowohl bei erwachsenen als auch bei pädiatrischen Patienten mit reduzierter linksventrikulärer Funktion, eine Symptom-Triade von Herzversagen, Embolien und Arrhythmien, wobei letztere stark variieren und von Vorhofflimmern bis hin zu dauerhafter ventrikulärer Tachykardie reichen. Es muss aber nicht bei diesen drei Symptomen bleiben, sondern es treten gelegentlich auch Palpitationen, Kurzatmigkeit, Linksschenkelblock oder Lungenembolien auf. Einige der Patienten bleiben sogar asymptomatisch.

Bei erwachsenen Patienten wurden im Gegensatz zu Kindern mit LVNC weder faziale Dismorphien noch Wolff-Parkinson-White-Syndrom (WPW-Syndrom) entdeckt. Weitere Unterschiede zwischen den beiden Patientengruppen sind die seltere familiäre Häufung und das häufigere Auftreten von kompletten Schenkelblock bei Erwachsenen¹³.

1.3.2 Diagnostik

Mit der enormen Entwicklung der diagnostischen Möglichkeiten innerhalb kurzer Zeit stieg auch die Zahl der diagnostizierten LVCM-Patienten in den letzten Jahren drastisch an. Zuvor galt die LVCM ohne die in 1.3.1 genannten Begleiterscheinungen mit einer Prävalenz von 0,05-0,24 % als extrem selten.

Die beiden derzeit gängigen Untersuchungsmethoden sind die Echokardiographie und das Kardio-MRT¹².

Echokardiographie

Es existieren mehrere Definitionen zur echokardiographischen Diagnose der LVNC.

Während bei der einen Methode die Trabekellänge mit der Dicke der kompakten Herzwand in verschiedenen echokardiographischen Ansichten und in unterschiedlichen Stufen der End-Diastole im linken Ventrikel verglichen werden (Jenni-Kriterien) ist bei einer anderen das Verhältnis zweier Myokardschichten zueinander in der End-Systole aus axialer Sicht ausschlaggebend. In einem weiteren Vorschlag hängt die Diagnose von der Anzahl der sichtbar hervorstehenden Trabekel in der Diastole aus apikaler Sicht ab. Im Gegensatz zu den ersten beiden Vorschlägen basiert dieser auf einer post-mortem-Studie¹².

Magnet Resonanz Tomographie (MRT)

Das MRT bringt den Vorteil einer sehr guten räumlichen Auflösung mit sich und bietet darüber hinaus die Möglichkeit, das Verhältnis von dichten zu weniger dichten Wandschichten zu bewerten.

Im Prinzip werden zur Diagnosefindung abgewandelte Formen der in der Echokardiographie verwendeten Kriterien verwendet. Die Anteile von kompakter und weniger kompakter Myokardschicht werden hier in der Diastole betrachtet ¹².

1.3.3 Therapie

Die Therapie der NC ist eine symptomatische und lässt sich unterteilen in Behandlung der Herzinsuffizienz, antiarrhythmische Therapie und Prävention von thrombembolischen Ereignissen ¹⁴.

Je nach NYHA-Grad behandelt man die Herzinsuffizienz i.d.R. medikamentös mit einer Kombination aus ACE-Hemmern (ab NYHA I), Betablockern (ab NYHA II, bei Hypertonie und Zustand nach Herzinfarkt auch schon bei NYHA I), Diuretika (ab NYHA III), Aldosteronantagonisten (ab NYHA III, bei ACE-Hemmer-Unverträglichkeit oder Zustand nach Herzinfarkt auch schon ab NYHA I) und Herzglykosiden (ab NYHA III) ¹⁵.

Eine ICD-Implantation ist indiziert bei Patienten mit einer anhaltenden ventrikulären Tachykardie oder nach einem überlebten Herzstillstand. Bei WPW-Syndrom und anderen supraventrikulären Tachykardien sollte eine Ablation in Erwägung gezogen werden.

Der Nachweis von Vorhofflimmern, eingeschränkter linksventrikulärer Pumpfunktion oder intrakardialen Thromben stellt die Indikation für eine Langzeitkoagulation ¹⁴.

1.3.4 Genetik

Im Zusammenhang mit LVNC wurden bereits eine Reihe von genetischen Auffälligkeiten gefunden, von welchen hier die wichtigsten beschrieben werden.

So ließen sich zum Beispiel x-chromosomal vererbte Mutationen im G4.5-Gen, welches zu den Taffazin-Proteinen (TAZ) gehört, nachweisen. Diese Gruppe von Proteinen befindet sich in den Mitochondrien von Skelett- und Herzmuskelzellen und besitzt eine Acetyltransferase-Funktion¹².

Außerdem fielen Mutationen im ZASP, einem zytoplasmatisch vorkommenden Protein der Z-Linie in Skelett- und Herzmuskelzellen, auf, welches durch die Interaktion über seine PDZ-Domäne mit weiteren PDZ-Domänen-Proteinen die Anordnung der Membranproteine beeinflusst, und somit eine wichtige Rolle bei der Erhaltung der physiologischen Architektur der Zelle spielt¹².

Alpha-Dystrobrevin ist ein zytoskeletales Protein, das die extrazelluläre Matrix mit dem Dystrophin-Zytoskelett der Muskelzelle verbindet. Die Mutationen zeigen hier eine besonders hohe Variabilität bezüglich der phänotypischen Ausprägung und folgen i.d.R. einem autosomal dominanten Erbgang.

Mutationen in Sarkomer-Proteinen des dünnen und dicken Filaments sind bereits von HCM- und DCM-Patienten bekannt, können aber ebenso ursächlich für einen LVNC-Phänotyp sein¹². Das MYH7-Gen, welches für die kardiale β -Myosin-heavy-chain kodiert, ist dabei von besonders großer Bedeutung¹⁶.

Der Zusammenhang von Funktion des Lamin A/C, einem Protein der Kernlamina, und dem Vorkommen von LVNC bei Mutationen dieses Proteins ist weniger offensichtlich als in den zuvor beschriebenen Fällen¹².

Trotzdem gibt es noch viele NC-Fälle, bei denen keine ursächliche Mutation gefunden werden konnte.

1.4 Desmin

1.4.1 Eigenschaften und Aufbau

Das Intermediärfilament Desmin ein sehr zugfestes Protein, aufgebaut aus Tetrameren, welche wiederum aus jeweils zwei antiparallel angeordneten Dimeren bestehen. Letztere bestehen wiederum aus einem Paar langer, parallel zueinander liegender Moleküle, welche sich in Kopf, Mittelteil (Rod Domain) und Schwanz unterteilen lassen ¹⁷.

Während der in 1A, 1B, 2A und 2B gliederbare, helikale Mittelteil mit seiner hoch konservierten Struktur und Sequenz von drei nicht-helikalen Zwischenstücken unterbrochen wird, sind der aminoternale Kopfteil und der carboxyterminale Schwanz in ihrer gesamten Länge nicht-helikal ¹⁸.

Das Gen befindet sich auf dem langen Arm von Chromosom 2 hat eine Gesamtlänge von 8363 bp wobei 6115 bp den Introns zuzurechnen sind und somit nicht kodieren. Die restlichen 2248 bp der Exons kodieren für 468 Aminosäuren, die sich wie in Abbildung 5 skizziert auf Kopf-, Mittelteil und Schwanz verteilen. Die Größen der Exons und Introns lassen sich Tab.1 entnehmen.

Exon	Länge in bp	Intron	Länge in bp
1	664	1-2	1054
2	61	2-3	95
3	96	3-4	148
4	162	4-5	171
5	126	5-6	386
6	221	6-7	2216
7	44	7-8	1842
8	83	8-9	203
9	791		

Tab. 1: Größen der einzelnen Exons und Introns des Desmin-Gens.

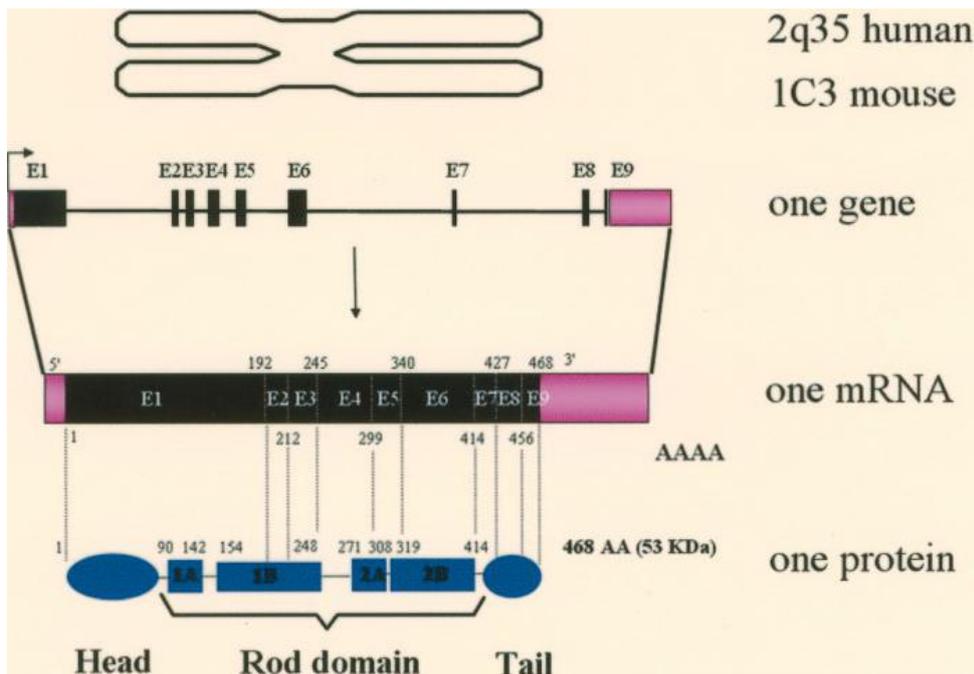


Abb. 5: Überblick über wichtige Daten zum Desmin-Gen. Von oben nach unten:

Chromosomen-Lokalisation bei Mensch und Maus, Verteilung von Exons und Introns über das Gen, Größe der Exons und der gesamten mRNA in Aminosäuren, Aufbau des Proteins in seine Abschnitte¹⁹.

1.4.2 Vorkommen und Funktion

Desmin hat als muskuläres Intermediärfilament die Aufgabe eines Stützgerüsts in allen Muskelzellen.

In der Skelettmuskulatur wird jede Myofibrille auf Höhe der Z-Scheibe von dem Intermediärfilament umspinnen, welches durch Plekin am Sarkolemm fixiert ist. Auf diese Weise sind sämtliche Myozyten miteinander vernetzt, was zu der regelmäßigen, namensgebenden Querstreifung führt, welche bei der glatten Muskulatur fehlt. Bei dieser durchzieht Desmin eher netzartig die Zelle und ist im Zytoplasma und an der Innenseite der Plasmamembran in sogenannten Verdichtungszonen verankert.

Im Herzmuskelgewebe liegen die zellulären Haft- und Kommunikationskontakte im Glanzstreifen (Discus intercalaris), welcher im lichtmikroskopischen Bild als treppenförmiger, dunkler Streifen zwischen den Kardiomyozyten auffällt.

Im Gegensatz zu den Aktinfillamenten, welche der Innenseite der Fascia adhaerens entspringen, macht Desmin nur einen kleinen Teil der Adhärenskontakte aus und inseriert an Desmosomen. Diese finden sich in der Regel zwischen den longitudinal zur Längsachse der Zellen verlaufenden Gap Junctions und der transversalen Fascia adhaerens¹⁷.

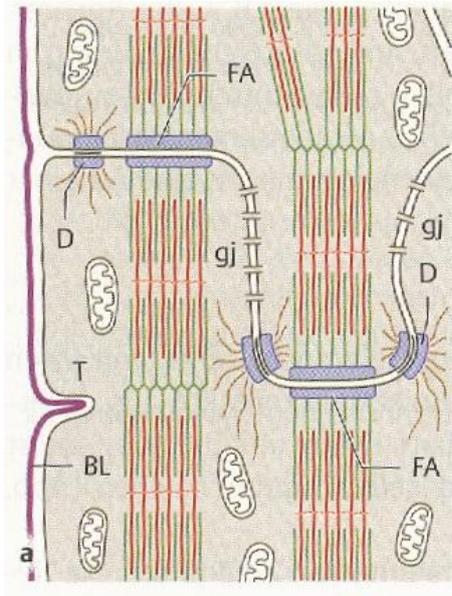


Abb. 6: Schema von Herzmuskelgewebe. Die braunen Streifen stellen Desmin dar.

FA= Fascia adhaerens,

gj= gap junctions,

BL= Basal lamina,

T= Mündung T-Tubulus,

D= Desmosom ¹⁷

1.4.3 Assoziierte Erkrankungen

Durch die zuvor beschriebene Bedeutung von Desmin ist die Vorstellung, dass ein fehlerhaftes Vorliegen dieses Proteins vielseitige muskuläre Pathologien mit sich bringen kann, naheliegend. Die krankheitsverursachenden Mutationen befinden sich bevorzugt im 2B-Abschnitt des Mittelteils ²⁰. Alle Erkrankungen, die durch eine Mutation in Desmin oder einem Desmin-assoziierten Protein, z.B. α B-Crystallin-Gen, hervorgerufen wurden, werden als Desmin-related Myopathies (DRM) bezeichnet.

Bei der Desmin-Myopathie steht symptomatisch in der Regel eine distal an den Extremitäten beginnende Muskelschwäche im Vordergrund, die sich nach proximal hin ausbreitet und auch Genick-, Gesichts-, äußere Augen- und Atemmuskulatur befällt. Hierbei gibt es Fälle mit und ohne Herzbeteiligung, d.h. mit oder ohne begleitende CM ²¹. Allerdings kann sich die DRM auch primär als CM äußern, beispielsweise als arrhythmogene rechtsventrikuläre CM (ARVC), bei welcher es durch den progredienten Austausch von hauptsächlich rechtsventrikulär gelegenen Myozyten durch Fettgewebe zu gehäuften ventrikulären Rhythmusstörungen mit einer hohen Gefahr des plötzlichen Herztods kommt ²², als dilatative CM (DCM) mit reduzierter Herzwanddicke und stark vergrößertem Ventrikellumen, was zu einer starken systolischen Dysfunktion und Herzversagen führt ^{2,23} oder als restriktive CM (RCM), bei welcher eine abnorme Starrheit des Myokards dazu führt, dass bei einem nur geringen ventrikulären Volumenanstieg der Druck stark zunimmt und die ventrikulären Pumpleistung stark eingeschränkt ist ^{3,24}.

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Die Hypertrophe Kardiomyopathie (HCM) ist nicht nur die häufigste Form der genetischen Kardiomyopathien, sondern auch in dem meisten Fällen ursächlich für einen plötzlichen Herztod bei jungen Menschen. Obwohl bereits über 400 Mutationen in mehr als 13 Genen mit der Pathogenese der HCM in Verbindung gebracht wurden, wird, selbst beim Screening aller Krankheitsgene, bei ca. 50% der Fälle die zugrunde liegende Mutation nicht gefunden.

Die Non-Compaction Kardiomyopathie (NC) ist seltener als die HCM, macht aber dennoch fast 10% der primären Kardiomyopathien aus. Sie ist gekennzeichnet durch einen zerklüfteten linken Ventrikel mit prominentem Trabekelwerk und tiefen intertrabekulären Fortsätzen. Auch hier wurden schon einige krankheitsassoziierte Gene gefunden, aber es gibt ebenfalls noch viele Fälle, bei welchen sich in keinem dieser Gene eine Mutation gezeigt hat.

Desmin ist ein Intermediärfilament mit großer Bedeutung für Aufbau und Struktur in allen Muskelgeweben und spielt eine wichtige Rolle bei der Genese von Myopathien und verschiedenen Kardiomyopathien.

In dieser Arbeit soll zum einen bei einer Gruppe von HCM-Patienten systematisch das Desmin-Gen untersucht werden, da es bislang nur wenige Daten gibt, die den Zusammenhang von Mutationen in diesem Gen und der HCM herstellen.

Da NC-Patienten, bei denen eine Desmin-Mutation gefunden wurde, bisher in keiner Literatur auftauchen und die zuvor beschriebenen Besonderheiten der kardiomyozytären Struktur bei NC und die strukturelle Bedeutung des Desmins durchaus in einem Zusammenhang stehen könnten, wird in dieser Arbeit außerdem eine Gruppe von NC-Patienten auf Mutationen in diesem Gen untersucht.

Die genetische Analyse der beiden Patientengruppen soll mittels PCR und direkter Sanger-Sequenzierung erfolgen. Alle neun kodierenden Exons des Desmin-Gens sollen systematisch auf genetische Varianten hin untersucht werden.

2. Methoden und Materialien

2.1 Patientenkollektiv

Insgesamt wurde die DNA von 241 nicht verwandten Patienten untersucht, die entsprechend aufgeklärt in die Studie eingewilligt haben. Davon waren 194 HCM-Patienten, 47 NC-Patienten. Eingeschlossen wurden HCM-Patienten mit einer echokardiographisch festgestellten Septumdicke ≥ 13 mm und NC-Patienten mit einem Verhältnis von Trabekellänge zu Herzwanddicke die nach den Jenni-Kriterien (siehe 1.3.2) diagnosegebend ist. Ausschlusskriterien waren bei beiden Patientengruppen das Vorliegen einer KHK oder anderer kardialer Begleiterkrankungen.

Alle hier untersuchten HCM-Patienten wurden zuvor auf die häufigsten krankheitsverursachenden Mutationen untersucht - mit negativem Ergebnis.

Ein positives Votum der Ethikkommission liegt vor.

2.2 DNA-Extraktion

Die DNA der Patienten (sowie die der Kontrollen), wurde schon vor Beginn der Arbeit aus Vollblut mittels Aussalzmethode extrahiert. Dies erfolgte mit dem Gerät Autopure LSTM nach dem Protokoll OM-0196 9/04 Rev B der Firma Genra Systems, Inc. Mittels Agarosegelelektrophorese konnte die Konzentration bestimmt werden. Hierzu wurde 1,5 % Agarose verwendet und ein DNA-Standard der Konzentration 25ng/ μ l mitgeführt, anhand dessen die DNA-Konzentration der Proben überprüft und, wenn nötig, korrigiert werden konnte. Die Herstellung des Agarosegels und die Durchführung der Elektrophorese werden im Abschnitt 2.3.4 genauer beschrieben.

2.3 Polymease-Chain-Reaktion (PCR)

Die PCR ist ein wichtiges, enzymatisches Verfahren zur Amplifizierung von bestimmten DNA-Abschnitten. Der Cycler erhitzt oder kühlt den PCR-Ansatz hierfür auf spezifische Temperaturen und ermöglicht so, dass die einzelnen Teilreaktionen der PCR nacheinander ablaufen.

Schritt 1: Denaturierung

94°C

Der DNA-Doppelstrang wird denaturiert und in zwei Einzelstränge gespalten.

Schritt 2: Primer-Annealing

50-70°C

Die Primer hybridisieren an die komplementären Sequenzen der DNA. Hiermit ist der Startpunkt der Taq-Polymerase gegeben. Die Temperatur ist dabei abhängig vom jeweiligen Primerpaar.

Schritt 3: Extension

72°C

Die Taq-Polymerase synthetisiert aus den im Reaktionsansatz vorliegenden Desoxynukleotidtriphosphaten (dNTPs) einen Komplementärstrang, welcher an den Matrizenstrang hybridisiert wird, sodass ein neuer Doppelstrang vorliegt.

Schritt 4: Kühlung

4°C

Die Schritte 1 bis 3 werden 30 - 45 mal zyklisch wiederholt, damit am Ende der PCR die jeweilige DNA-Sequenz ausreichend vorliegt.

Im Folgenden ist die Durchführung aller relevanten Schritte vor, während und nach der PCR beschrieben.

2.3.1 Primer-Design

Primer sind kurze DNA-Fragmente, welche zur Amplifizierung einzelner Abschnitte eines Gens benötigt werden. Sie dienen als Startpunkt der DNA-Polymerase und setzen kurz vor (*Forward Primer*, PF) und kurz nach (*Reverse Primer*, PR) dem zu amplifizierenden Exon an.

Zur Ermittlung einer passenden Basensequenz wurde die Sequenz der genomischen DNA (gDNA) des Desmin-Gens in das Programm OLIGO 4.0 kopiert.

Um ein optimales Ergebnis zu erlangen, müssen beim Primer-Design folgende Richtlinien befolgt werden:

- Die Primer sollten eine Länge von 18 bis 24 bp haben.
- Sie sollten 30 bis 40 bp von dem entsprechenden Exon entfernt liegen um dieses später bestmöglich auswerten zu können.
- Die beiden Primer eines Primerpaars sollten sich in ihrer Schmelztemperatur um nicht mehr als 5° unterscheiden um gute Annealing-Bedingungen zu gewährleisten.
- Diese Schmelztemperatur sollte zwischen 50 und 70°C liegen.
- Das Amplifizierungsprodukt sollte nicht länger als 600 bp sein um es später auf gesamter Länge gut auswerten zu können.
- Die beiden Primer eines Primerpaars und jeder Primer mit sich selbst sollten maximal drei komplementäre Basen aufweisen um zu verhindern, dass sich Duplexe oder sogenannte *Hairpins* und *Loops* bilden und sich so die Primer nichtmehr an die DNA anlagern können.

Um den Arbeitsaufwand zu minimieren, kann für kleine, nahe aneinander liegende Exons auch ein Primerpaar verwendet werden. Dies ist hier bei den Exons 2 und 3 sowie 4 und 5 der Fall. So wurden für die 9 Exons des Desmin-Gens 7 Primerpaare gefunden, welche von der Firma BioTez Berlin-Buch synthetisiert wurden.

Für die folgenden Arbeitsschritte wurden die Primer (50 pmol/μl) mit destilliertem Wasser (dH₂O) auf eine Konzentration von 5 pmol/μl verdünnt.

In folgender Tabelle sind die Sequenzen, Längen und Schmelzpunkte der Primer, sowie der Länge der PCR-Produkte aufgelistet.

Primer	Sequenz	Primerlänge	Produktlänge	Schmelzpunkt	ΔT
DES 1 F DES 1 R	CTG ATG TCA GGA GGG ATA CA AGA AGG CAG GTG CTG ACA G	20 bp 19 bp	803 bp	60°C 60°C	0°
DES 2/3 F DES 2/3 R	CTT TAT CAC CCG CAA CTG TC TAT TCC CAG CCA GAG CCT C	20 bp 19 bp	383 bp	60°C 60°C	0°
DES 4/5 F DES 4/5 R	AGG CTC TGG CTG GGA ATA G AGC CTC ACA GTC CCC ACA TA	19 bp 20 bp	744 bp	60°C 62°C	2°
DES 6 F DES 6 R	TTT GGG CTG CTA GTG TCC TC CGA CAA GAG CGA AAC TCC A	20 bp 19 bp	423 bp	62°C 58°C	4°
DES 7 F DES 7R	CGG GGT TTC ACT GTG TTA G CCT TTT TCT TCC CCA GAC TC	19 bp 20 bp	327 bp	58°C 60°C	2°
DES 8 F DES 8 R	GGG CTG AAG GAA AGG TGT TA CCC CCC AGA CAC ATC CAT A	20 bp 19 bp	307 bp	60°C 60°C	0°
DES 9 F DES 9 R	TGG CTA GTG GGG CAA GAG A TGG CAG TCA AGA CAA CAG GG	19 bp 20 bp	927 bp	60°C 62°C	2°

Tab. 2: Basensequenz der hier ermittelten und verwendeten Primerpaare mit der jeweiligen Primer- und Produktlängen, den Schmelzpunkten und der Differenz der Schmelzpunkte (ΔT).

Hieraus geht hervor, dass im Bereich der Exons 1, 4/5 und 9 der Abstand zwischen PF und PR größer ist als in den Richtlinien beschrieben. Im Bereich des Exons 1 und 9 stellte dies kein Problem dar, da die Sequenzierung ab dem Start-Codon bzw. bis zum Stopp-Codon gut ausgewertet werden konnte. Bei Exon 4 und 5 konnte Auswertungsschwierigkeiten dadurch behoben werden, dass sowohl vorwärts als auch rückwärts sequenziert wurde. Dies war auch bei Exon 6 erforderlich. Genaueres hierzu in 2.4.3.

2.3.2 PCR-Optimierung

Um für jedes Exon die optimalen PCR-Bedingungen zu ermitteln, muss zunächst mit jedem Primerpaar eine PCR innerhalb eines Temperaturgradienten durchgeführt werden. Hierfür wird Proben-DNA verwendet. Die Annealing-Temperatur erstreckt sich beim Gradienten-Programm in 12 Schritten zwischen 50 und 70°C. Es ist vorgegeben, auf welcher Position welche genaue Temperatur erreicht wird, sodass man später im Bild der Gelelektrophorese den besten Bandenstreifen der entsprechenden Temperatur zuordnen kann. Kriterien dafür sind die deutliche Sichtbarkeit der Bande und die Abwesenheit von Nebenprodukten, welche sich als weitere Banden zeigen (siehe 3.2).

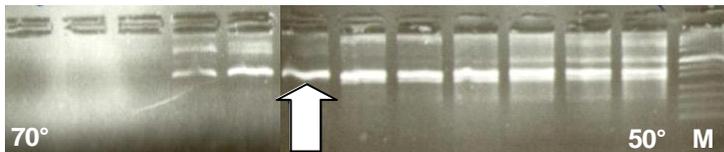


Abb. 7: Beispiel eines Gradienten zwischen 50°C und 70°C, hier DES 7. Der Pfeil markiert die Position an welcher am besten den zuvor beschriebenen Zeichen für eine günstige Annealing-Temperatur erfüllt sind. In diesem Fall entspricht dies 61,8°C.

Anschließend wurde bei der ermittelten Annealing-Temperatur und dem standardmäßigen Master-Mix-Ansatz (siehe 2.3.3) eine weitere PCR mit verschiedener Proben-DNA und 40 Zyklen durchgeführt. Wenn dies zu einem guten Ergebnis führte, wurden die Bedingungen für dieses Exon so belassen.

Bei zu viel Nebenprodukt, aber starken Banden wurden im nächsten Schritt die Zyklen reduziert. Zeigen sich nur schwache Banden, können diese durch den Einsatz des Enhancers Betain oder durch Erhöhung der Zyklenzahl verstärkt werden.

Zeigt sich trotz dieser Versuche ein unbefriedigendes Bild, kann man versuchen ob es durch den Einsatz des Thermo-Taq-Kits das Ergebnis verbessert wird.

2.3.3 PCR-Durchführung

Während der PCR befinden sich jeweils 25 µl des Reaktionsgemisches in den einzelnen Tubes der achter Sets, welche vor dem Start des Cyclers auf Eisblöcken gelagert werden um verfrühte unerwünschte Reaktionen zu vermeiden. Die 25 µl setzt sich aus 1 µl der in der Konzentration 25 ng/µl vorliegenden DNA (siehe 2.2) und 24 µl Master-Mix zusammen, welcher Folgendes beinhaltet.

	Menge (µl)	Konzentration
HPLC-H ₂ O	17,4 (14,9)	
NH ₄ -Puffer	2,5	10 x
MgCl ₂	1,5	50 mmol
PF	1	5 pmol/µl
PR	1	5 pmol/µl
dNTP-Mix	0,3	20 mmol/µl
Taq-Polymerase	0,3	5 U/µl
Betain	0 (2,5)	

	Menge (µl)	Konzentration
HPLC-H ₂ O	12,4	
NH ₄ -Puffer	2,5	10x
MgCl ₂	1,5	25mM
PF	1	5 pmol/µl
PR	1	5 pmol/µl
dNTP-Mix	0,3	20 mmol/µl
Thermo-Taq	0,3	5U/µl
Enhancer	4	10x

Tab. 3 & 4: Zusammensetzung des PCR-Master-Mix⁴.

Links: mit dem herkömmlichen Kit, die Werte in Klammer gelten nur für die Benutzung von Betain.

Rechts: mit Thermo-Taq-Kit.

Die in den Tabellen erwähnten dNTPs wurden als Stammlösung mit einer Konzentration von 0,1 mol/l geliefert und anschließend auf 20 mmol/µl verdünnt. Sie enthalten zu gleichen Anteilen dATP, dTTP, dGTP und dCTP.

Pufferlösung und Magnesiumchloridlösung wurden im Kit mit der entsprechenden Taq-Polymerase geliefert und schaffen ein ideales Arbeitsmilieu für die Polymerase.

Betain bzw. der Enhancer dienen einer Verbesserung der Spezifität der Bindung und der PCR-Ausbeute.

Nachdem die Tubes verschlossen wurden, wurden sie gevortext und zentrifugiert bevor sie letztendlich das Cycler-Programm gestartet werden konnte.

2.3.4 Agarosegelelektrophorese

Um die Qualität der PCR-Produkte zu überprüfen, ist die Gelelektrophorese eine schnelle und relativ unaufwendige Methode. Hierzu wurden Agarosegele mit einer Größe von 2x8 Taschen (kleines Gel) oder 12x8 Taschen (großes Gel) gegossen, indem ein in der unten stehenden Tabelle aufgezeichnetes Gemisch aus Agarose und 1xTBE-Puffer in einer Mikrowelle aufgeköcht wurde und anschließend Ethidiumbromid zugesetzt wurde. Die Angabe zur Auspolymerisierung entspricht der Zeit, nach der das frisch gegossene Gel beladen werden kann.

	kleines Gel	großes Gel
1xTBE-Puffer	20 ml	100 ml
Agarose	0,6 g	3 g
Ethidiumbromid	1 µl	5 µl
Auspolymerisierung	30 min	60 min

Tab. 5: Mischverhältnis und Aushärtungszeit zur Herstellung eines kleinen oder großen Agarosegels

Der 1xTBE-Puffer ist eine Verdünnung des 5xTBE-Puffers, welcher sich wie folgt zusammensetzt:

- 54 g Tris(base)
- 27,5 g Borsäure
- 20 ml EDTA 0,5 M
- ad 1000 ml H₂O

Vor der Beladung des auspolymerisierten Gels wird es in der in Flachbettgelkammer mit 1xTBE-Puffer übergossen. In die einzelnen Taschen werden jeweils 2,5 µl PCR-Produkt zusammen mit 2,5 µl Auftragspuffer Typ III pipettiert. Letzterer beinhaltet den Farbstoff Bromphenolblau, was das genaue Auftragen in die Taschen erleichtert.

Um später überprüfen zu können, ob auch tatsächlich das gewünschte PCR-Produkt entstanden ist, lässt man einen Molekulargewichtsmarker mitlaufen, dessen Legende man hier sieht.

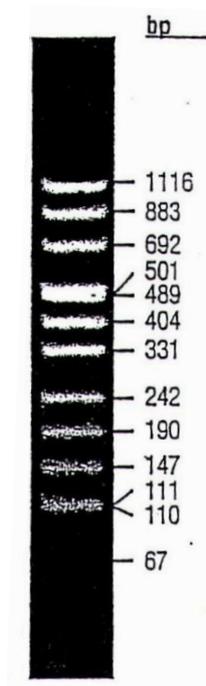


Abb. 8: Legende des Molekulargewichtsmarker TypVIII, MBI Fermentas. Die Zahlen neben den Banden geben die entsprechende Molekülgröße in bp an, die den bis zu dieser Position laufenden DNA-Fragmenten entspricht (fermentas)

Für 30 min beim kleinen Gel und 45 min beim großen Gel wird nach dem Auftragen ein Strom von 80 V an den Elektroden der Flachbettgelkammer angelegt. Die DNA-Fragmente wandern umso länger mit, je kürzer sie sind. Daraus ergibt sich für jedes PCR-Produkt eine spezifische Bandenlokalisierung. Sichtbar werden diese Banden durch das oben erwähnte Ethidiumbromid, das sich in die DNA-Doppelstränge einlagert und durch das UV-Licht eines Transilluminators erleuchtet. Das Bild aller durchgeführten PCRs wurde zu Protokollierung photographiert.

2.4 Sequenzierung

Um die Patientenproben auf Mutationen zu untersuchen, muss die Basenabfolge der einzelnen Exons sichtbar gemacht werden. Hierfür dient die automatische Sequenzierung nach Sanger. In eine Richtung wird hierbei ein Komplementärstrang zur DNA gebildet, der durch fluoreszenzfarbstoff-markierten Didesoxynukleotidbasen (ddNTPs) terminiert. Für jede Base wurde dafür ein Farbstoff mit anderem Absorptionsmaximum verwendet. Mit einem mikroprozessorgesteuerten Sequenzierungsgerät mit Elektrophorese- und Fluoreszenz-Detektionsfunktion kann durch diese Markierung die genaue Basenfolge der amplifizierten DNA-Sequenz ermittelt werden. Diese wird von dem Gerät als Elektropherogramm dargestellt.

2.4.1 Enzymatische Aufreinigung

Ein wichtiger Schritt vor der eigentlichen Sequenzierung ist die enzymatische Aufreinigung des PCR-Produkts, welche überschüssige Primer und dNTPs entfernt.

Hierzu werden unter ständiger Kühlung das PCR-Produkt mit Exonuklease I (Exo I), einem Enzym des Bakteriums *E.coli*, und Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP) vermischt und anschließend im Cycler erst 30 min auf 37 °C, dann 15 min auf 72°C erwärmt.

	Menge	Konzentration
Exo I	0,09 µl	20 000 U/ml
SAP	0,32 µl	1 U/µl
H ₂ O	2,59 µl	
PCR-Produkt	7 µl	

Tab. 6: Mischverhältnis zur Durchführung der enzymatischen Aufreinigung.

2.4.2 Herstellung der Sephadex-Platte

Mit der Herstellung der Sephadex-Platte muss bereits am Tag vor der Sequenzierung begonnen werden. Eine Füllhilfe ermöglicht es in jedes Well der Platte die ideale Menge Sephadex-Pulver zu geben. Dazu werden jeweils 300 µl HPLC-H₂O pipettiert und die Platte mit Deckel über Nacht in den Kühlschrank zum Quellen gestellt. Nach maximal 2 Tagen muss die Platte weiterbehandelt werden. Erst wird 5 min bei 1000 g das nach dem Quellen noch überschüssige Wasser in eine Waschplatte zentrifugiert. Dann werden zu Waschen noch mal 150 µl Wasser in jedes Well pipettiert und anschließend im selben Zentrifugationsprogramm wie zuvor erwähnt in die Waschplatte zentrifugiert. Nun ist die Platte bereit für die Beladung mit dem Sequenzierungsprodukt.

2.4.3 Durchführung der Sequenzierung

Von dem enzymatisch aufgereinigten PCR-Produkt (s. 2.4.1) werden jeweils 2 µl mit Wasser, Sequenzierungs-Puffer, einem Primer des entsprechenden Primerpaars und Big Dye Terminator zu einem Gemisch von 10 µl pro Tube zusammenpipettiert. Der im Kit mit dem Sequenzierungs-Puffer gelieferte Big Dye Terminator beinhaltet die für die Reaktion erforderlichen dNTPs, ddNTPs, eine thermostabile Ampli Taq DNA-Polymerase und Puffer.

	Menge
aufgereinigtes PCR-Produkt	2 µl
Seq-Puffer	1,75 µl
Big Dye	0,5 µl
Primer	1 µl
H ₂ O	4,75 µl

Tab. 7: Mischverhältnis zur Durchführung der Sequenzierung des enzymatisch aufgereinigten PCR-Produkts.

Das Programm, das nach Vortexen und Zentrifugation der Proben, im Cyclor gestartet wurde durchläuft die Temperaturstufen 96 °C, 50 °C und 60 °C in 25 Zyklen bevor das Produkt auf 4 °C gekühlt wird. Nach Ende des Cyclor-Programms wurde das gesamte Sequenzierungs-Produkt in die einzelnen Wells der Sephadex-Platte pipettiert und diese erneut für 5 min bei 1000 g zentrifugiert. Diesmal verwendet man aber nicht wie zuvor beschrieben eine Waschplatte, sondern eine Ladeplatte in die zuvor pro Well 13 µl HiDi-Formamid (*highly deionized formamide*) gegeben wurde.

Bevor die Ladeplatte abschließend in das Sequenzierungsgerät gegeben wurde, wurde sie verschlossen und eingefroren.

2.4.4 Auswertung

Hierzu wurden die vom Sequenzierungsgerät ABI 3100 Avant ermittelten Basenfolgen der einzelnen Patienten-Proben in das Auswertungsprogramm Sequencher 4.1 überspielt.

Um Auffälligkeiten in der Basenfolge einer Probe zu erkennen wurde das Alignment mit der Referenzsequenz verwendet. Für alle verdächtigen oder fragwürdigen Sequenzen musste in dem entsprechenden Exon nochmals eine neue PCR und anschließende Sequenzierung gemacht werden. Dies gilt auch für Proben, die aufgrund von Verunreinigungen nicht auswertbar waren oder sich mit dem Programm nicht öffnen ließen.

2.5 Übersicht über alle verwendeten Materialien

2.5.1 Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
Agarose	Biozym
Alkaline Shrimp Phosphatase	Roche
Ammoniumpersulfat	Pharmacia Biotech
BigDye Terminator Kit	Applied-Biosystems
Borsäure	Roth
Bromphenolblau	Pierce
dNTPs	Roth
EDTA	Roth
Ethidiumbromid	Roth
Exonuklease I	Roche
Glycerin	Serva
HI-DI Formamid	Applied-Biosystems
HPLC-Wasser	Roth
Molekulargewichtsmarker VIII (19-1114 Bp)	Roche
Natriumcarbonat	Roth
Natriumhydroxid	Merck
Primer	BioTeZ
Salzsäure	Merck
Sephadex G-50 Superfine	GE Healthcare
Taq-DNA-Polymerase –Kit	Perkin Elmer
Thermo-Taq-Kit	Epicentre
Tris(base)	Roth
Xylencyanol	Pierce

Tab. 8: Auflistung aller verwendeten Chemikalien in alphabetischer Reihenfolge mit den jeweiligen Hersteller.

2.5.2 Geräte

Gerät	Hersteller
Automatischer DNA-Sequenzer (ABI 373)	Perkin Elmer
Elektrophorese-Kammer Multiphor II	Pharmacia
Elektrophorese-Netzgerät PS 9009	Gibco BRL
Flachbettgelkammer Horizon 58	Gibco BRL
Gelkammer Horizon 58	Biometra
Kühlzentrifuge Sigma 3K30	Biometra
Magnetrührer RCT basic	IKA Labortechnik
Mikrowelle	AEG
Picofuge	Stratagene
Pipetten (0,1 - 10 µl, 10 - 100 µl, 1000 µl)	Eppendorf
Pipette, 8-Kanal (0,5 - 10 µl, 5 -50 µl)	Biozym
Thermocycler UNO	Biometra
Thermocycler PTC- 200	Biozym
Thermostat DRI-Block DB·2A	Techne
UV-Lampe TI 1	Biometra
Vortex REAX 2000	Heidolph
Waage 510 – 37	Kern
Wassermaschine	Memra Pure

Tab. 9: Auflistung aller verwendeten Geräte in alphabetischer Reihenfolge mit dem jeweiligen Hersteller.

2.5.3 Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller
96-Well Reaction Plate MicroAmp	Applied Biosystems
96-Well Assay System MultiScreen	Millipore
Cellophanfolie	Folia
Glasplatte	Amersham
Glaswanne	Assistent
Handschuhe Manufix sensitiv	Braun
Handschuhe Rotiprotect Nitril	Roth
Klebeband	Tesa
Parafilm	Folia
PCR Caps (8er-Deckelreihen)	Biozym
PCR Softstrips 0,2 ml (8er-Tube-Ketten)	Biozym
Pipettenspitzen	Cotech
Reaktionsgefäße	Biozym

Tab. 10: Auflistung aller verwendeten Verbrauchsmaterialien in alphabetischer Reihenfolge mit den jeweiligen Herstellern.

3. Ergebnisse

3.1 PCR-Optimierung

Alle Primer wurden wie in 2.3.2 beschrieben optimiert.

Exemplarisch für alle sieben Primerpaare werden hier nur die Ergebnisse von den Primerpaaren der Exons 4/5 und 7 detailliert beschrieben. Eine Übersicht über alle Ergebnisse der PCR-Optimierung wird in Tabelle 12 gegeben.

Exon 4/5

Der Gradient zeigte hier bei 53,2°C die deutlichste Bande. Bei 40 Zyklen und 53°C war jedoch mit der Proben-DNA noch sehr viel Nebenprodukt zu sehen. Das Erhöhen der Annealingtemperatur auf 54°C brachte zwar eine Besserung, jedoch noch keine ausreichende. Dies konnte allerdings durch eine zusätzliches Verringern der Zyklen auf 37 erzielt werden.

Die Auswertung der Sequenzierungen war immer nur für eines der beiden Exons möglich, d.h. in der Vorwärtssequenzierung war nur Exon 5 vollständig lesbar und in der Rückwärtssequenzierung nur Exon 4. Dies führte dazu, dass alle Proben vorwärts und rückwärts sequenziert werden mussten, führte so aber zu guten Ergebnissen.

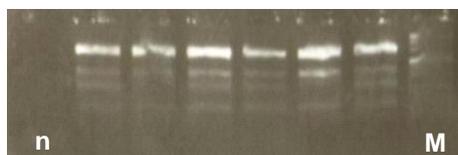


Abb. 9: PCR-Produkte des Exons 4/5 bei 53°C Annealingtemperatur und 40 Zyklen mit verschiedener Proben-DNA. M bezeichnet den Marker VIII, n die Negativprobe.

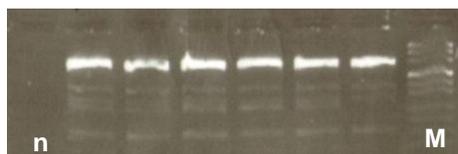


Abb. 10: PCR-Produkte des Exons 4/5 bei 54°C Annealingtemperatur und 40 Zyklen mit verschiedener Proben-DNA. M bezeichnet den Marker VIII, n die Negativprobe.



Abb. 11: PCR-Produkte des Exons 4/5 bei 54°C Annealingtemperatur und 37 Zyklen mit verschiedener Proben-DNA. n bezeichnet die Negativprobe, der Marker M hat hier nicht funktioniert. Die Laufzeit betrug hier 45min statt wie sonst bei kleinen Gelen 30 min.

Exon 7

Hier entstand die beste Bande im Gradienten bei 61,8°C. Diese war jedoch von etwas Nebenprodukt begleitet. Durch das Reduzieren der Zyklenzahl auf 38 bei einer aufgerundeten Annealingtemperatur von 62°C kamen sehr gute PCR-Ergebnisse zu Stande, die sich problemlos sequenzieren ließen.



Abb. 12: PCR-Produkte des Exons 7 bei 62°C Annealingtemperatur und 38 Zyklen mit verschiedener Proben-DNA. M bezeichnet den Marker VIII, n die Negativprobe.

Exon	T_{An} (°C)	Zyklen	
1	62	40	Mit Thermo-Taq
2/3	62	38	
4/5	54	37	
6	52	40	Mit Betain
7	62	38	
8	56	40	
9	63	40	Mit Thermo-Taq

Tab. 12: Optimale PCR-Bedingungen der einzelnen Primerpaare. T_{An} =Annealingtemperatur

3.2 Auswertung der Sequenzierungen der Patienten

Gefunden wurden insgesamt zehn verschiedene synonyme Einzelnukleotid-Polymorphismen (sSNPs), ein nicht-synonymer Einzelnukleotid-Polymorphismus (nsSNP) und eine Mutation. Als SNP bezeichnet man den Austausch einer Base der DNA-Sequenz ohne krankhaften Wert. Man unterscheidet die sSNPs, bei welchen die Aminosäuresequenz unverändert bleibt, von den nsSNPs, bei welchen sich durch den Basenaustausch das entsprechende Basentriplet so verändert, dass es für eine andere Aminosäure kodiert als ursprünglich. Bei einer Mutation kommt es ebenfalls zu einem Basenaustausch, der eine veränderte Aminosäuresequenz zur Folge hat. Diese haben aber, im Vergleich zu einer nsSNP, phänotypische Auswirkungen. Sie können vererbt werden oder spontan auftreten. Im Gegensatz zu den SNPs sind Mutationen sehr selten.

Exon 1

Alle Patienten zeigten die als rs1318299 und rs2017800 bekannten sSNPs, bei welchen die Basen an Position 75 und 93 der cDNA durch eine andere ersetzt wurde. Bei rs1318299 entspricht dies einer Tripletänderung von CCA zu CCG, bei rs 2017800 von AGT zu AGC. Die entsprechenden Aminosäuren bleiben unverändert. 98% dieser Veränderungen waren homozygot, nur bei drei HCM-Patienten und einem NC-Patient waren sie heterozygot. Keine Probe entsprach der Referenz-DNA.

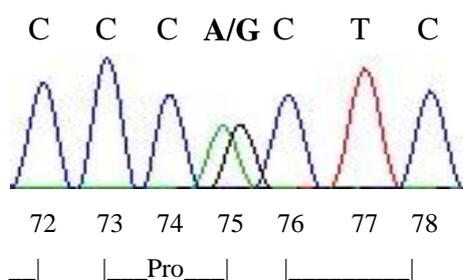


Abb. 13: c.75A>G, heterozygot

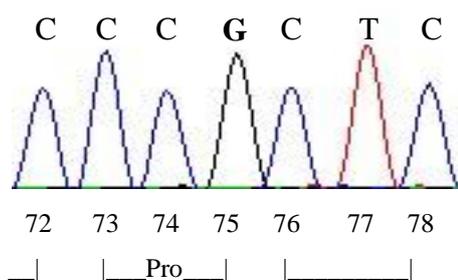


Abb. 14: c.75A>G, homozygot

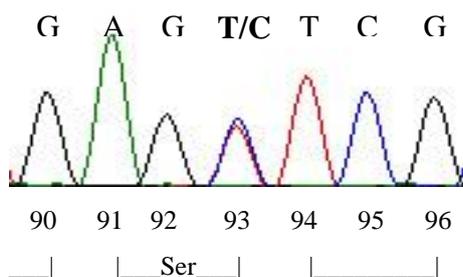


Abb. 15: c.93T>G, heterozygot

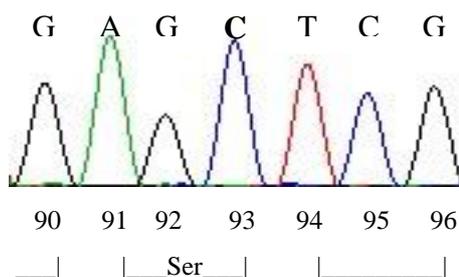


Abb. 16: c.93T>G, homozygot

Eine weitere bekannte Variation wurde bei drei HCM- und fünf NC-Patienten gefunden. Das C an Position 408 der cDNA wurde hier durch T ersetzt. Die Kodierung des Triplets für Leucin bleibt erhalten. In allen acht Fällen handelt es sich um heterozygote Veränderungen.

Auch eine unbekannte Variation wurde in heterozygoter Form bei einem HCM-Patienten gefunden. Es handelt sich hierbei ebenfalls um ein sSNP an Position 150 der cDNA (c.150G>T).

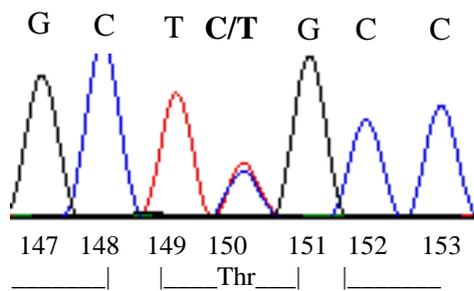


Abb. 17: c.150G>T, heterozygot

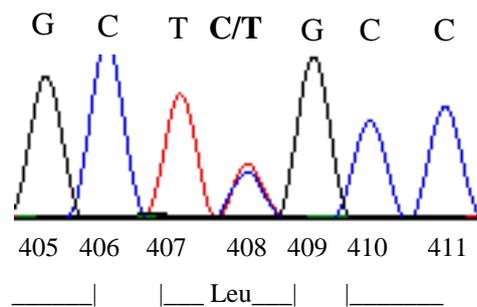


Abb. 18: c.408C>T, heterozygot

Exon 2

Bei zwei HCM-Patienten zeigt sich hier an Position 638 ein heterozygoter Basenaustausch von C zu T. Diese nicht synonyme Variation ist bereits bekannt unter der ID rs41272699. Das Basentriplet codiert nun nicht mehr für die Aminosäure Alanin sondern für Valin.

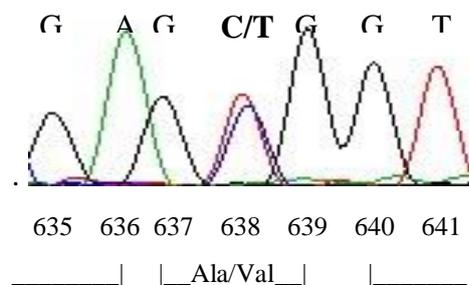


Abb. 19: c.638C>T, heterozygot

Exon 3

Hier konnte eine synonyme, bisher nicht beschriebene Variation entdeckt werden welche bei einem HCM-Patienten heterozygot auftritt. Die Aminosäure Serin an Stelle 231 entsteht hier anstatt durch die Basenfolge TCT durch TCC.

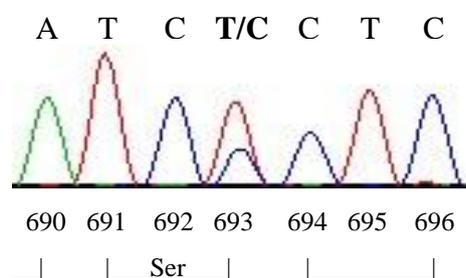


Abb. 20: c.693T>C, heterozygot

Exon 4

Die Variation, die in 68% der HCM- und 51% der NC-Proben vorkommt ist bereits bekannt (rs1058261) und synonym (Asp276Asp). Sie zeigt sich durch einen Basenaustausch von C>T auf Position 828. Insgesamt waren es 114 heterozygote und 18 homozygote HCM-Patienten und 19 heterozygote und 9 homozygote NC-Patienten.

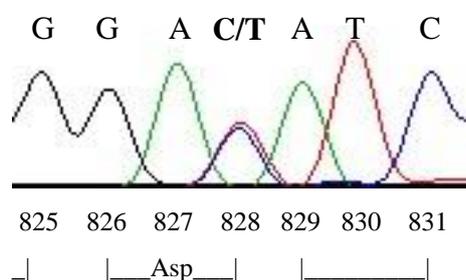


Abb. 21: c.828C>T, heterozygot

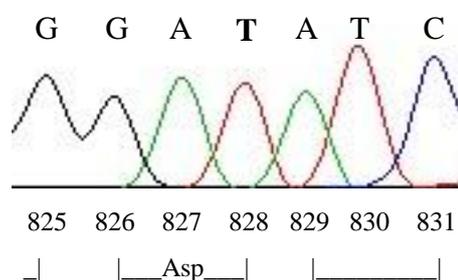


Abb. 22: c.828C>T, homozygot

Exon 5

Auch hier zeigte sich eine sehr häufige synonyme Variante. Diese befindet sich auf Position 1014 der cDNA und ersetzt G durch C. Bezüglich der Häufigkeit und der Hetero-Homozygotitäts-Verteilung zeigen sich bei den NC-Patienten genau die gleichen Zahlen wie bei der Variation in Exon 4. Bei den HCM-Patienten weichen sie nur minimal ab.

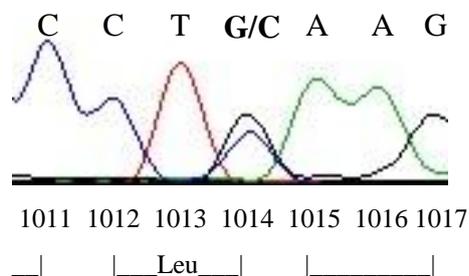


Abb. 23: c.1014G>C, heterozygot

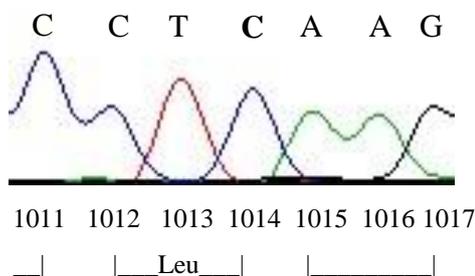


Abb. 24: c.1014G>C, homozygot

Exon 6

In ca. der Hälfte aller Patienten (48,94% bei NC, 53,61% bei HCM) findet sich in Exon 6 die unter der ID rs1058284 bekannte synonyme Variation (Ala368Ala), bei der das G an Position 1094 in der cDNA durch A ersetzt ist. Beim HCM-Kollektiv sind von den 104 Patienten mit dieser Variation 96 heterozygot und 8 homozygot, bei NC sind es 18 Heterozygote und 9 Homozygote.

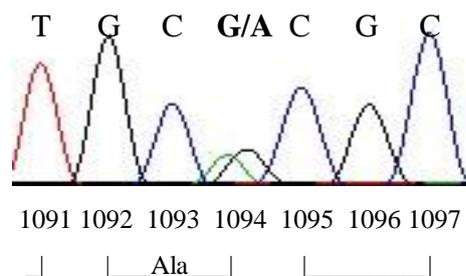


Abb. 25: c.1094G>A, heterozygot

Exon 7

Es handelt sich hierbei um ein kurzes, problemlos zu sequenzierendes Exon. Weder bei den HCM- noch bei den NC-Patienten gab es Sequenzveränderungen.

Exon 8

Bei einem Patienten (A1-1) zeigte sich an Position c.1325C ein heterozygoter Basenaustausch von C zu T. Aus dem Triplet ACC wird so ATC. Ersteres kodiert für die neutrale Aminosäure Threonin, wobei hingegen das neue Triplet kodierend für Isoleucin (ebenfalls neutral) ist. Es handelt sich um eine Mutation, die bereits im Zusammenhang mit MFM beschrieben wurde²⁴.

Es war möglich Blut von einigen Familienangehörigen des Patienten zu analysieren. Die Ergebnisse der Untersuchung der daraus extrahierten DNA sind in 3.3 beschrieben.

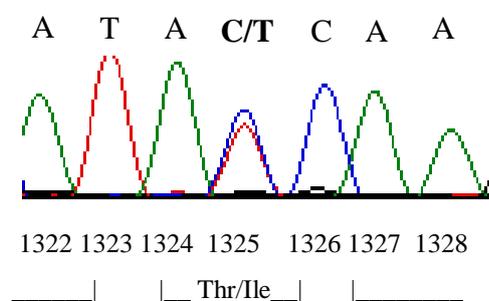


Abb. 26: c.1325C>T, heterozygot

Exon 9

Da es sich bei Exon 9 um das letzte Exon dieses Gens handelt, wurde es bis zum Stoppkodon TAA ausgewertet. Dabei konnten keine Auffälligkeiten gefunden werden.

3.3 Familie A

Von dem HCM-Patienten (A1-1), bei welchem die Missense-Mutation Thr442Ile in Exon 8 entdeckt wurde, konnte ein Teil der Familie ausfindig gemacht werden. Die Frau (A1-2) und die drei Söhne (A2-1, A2-2, A2-3) waren bereit ihre DNA ebenfalls auf Mutationen untersuchen zu lassen. Alle drei Söhne sind zu diesem Zeitpunkt kinderlos. Die Untersuchung umfasst somit zwei Generationen.

Die Methodik unterschied sich nicht vom in 2.2 – 2.4 beschriebenen Vorgehen, allerdings wurde nur Exon 8 untersucht.

Bei zweien der Söhne (A2-1, A2-2) wurde die Mutation ebenfalls gefunden, die Frau und Sohn A2-3 entsprachen dem Wildtyp.

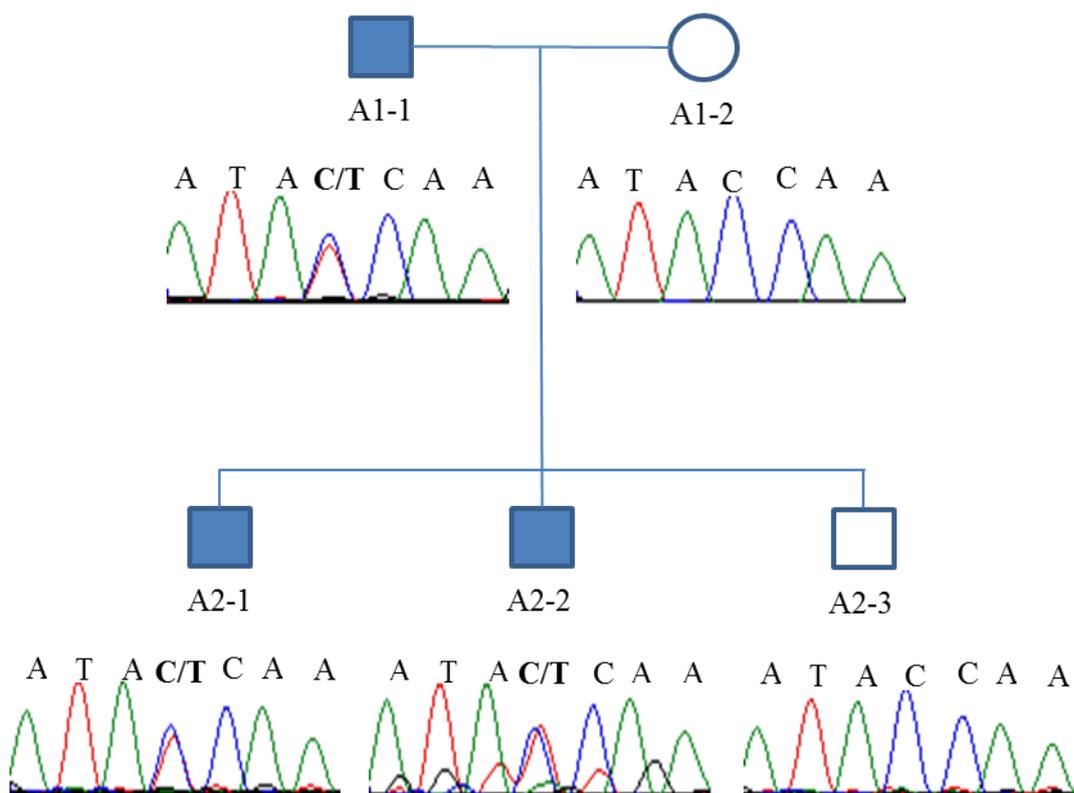


Abb. 27: Stammbaum der untersuchten Familie A mit den dazugehörigen Chromatogrammen.

■ = männlich, erkrankt. □ = männlich, gesund. ○ = weiblich, gesund.

3.4 Überblick über die Ergebnisse

3.4.1 HCM-Patienten

SNPs

Insgesamt zeigten sich acht verschiedene sSNPs (siehe Tabelle 14). Sie finden sich in den Exons 1,3,4,5 und 6. Die Häufigkeiten sind dabei sehr unterschiedlich und erstrecken sich von nur einer Probe heterozygot wie bei c.150G>T oder c.693T>C bis zu beinahe allen Proben homozygot bei c.75A>G und c.93T>C (siehe Tabelle 13).

Bis auf c.150G>T (Exon 1) und c.693T>C (Exon3) sind alle sSNPs bekannt und in DB SNP erfasst.

Bei zwei HCM-Patienten zeigte sich die bekannte nsSNP c.638C>T mit der Variation ID rs41272699. Alanin wird hier in der Aminosäuresequenz durch Valin ersetzt.

Mutation

Thr442Ile taucht im ursprünglichen Patientenkollektiv zwar nur einmal auf, allerdings zeigen noch zwei der Söhne des entsprechenden Patienten diese bekannte Mutation in Exon 8.

3.4.2 NC-Patienten

SNPs

Wie bei den HCM-Patienten wurden hier die synonymen SNPs c.75A>G (Exon 1), c.93C>T (Exon 1), c.408C>T (Exon 1), c.828C>T (Exon 4), c.1014G>C (Exon 5) und c.1094G>A (Exon 6) zu ähnlichen Anteilen gefunden (siehe Tabelle 13).

Unbekannte sSNPs konnten hier nicht gefunden, ebenso wenig wie nsSNPs.

Mutationen

Bei den NC-Patienten wurde keine Mutation gefunden.

3.3.3 Tabellarische Zusammenfassung

Variante	Variation type	HCM		NC	
		Probeanzahl	Probenanteil	Probeanzahl	Probenanteil
c.75A>G	gesamt	194	100%	47	100%
	homozygot	191	98,45%	46	97,87%
	heterozygot	3	1,55%	1	2,13%
c.93T>C	gesamt	194	100%	47	100%
	homozygot	191	98,45%	46	97,87%
	heterozygot	3	1,55%	1	2,13%
c.408C>T	gesamt	3	1,55%	5	10,64%
	heterozygot	3	1,55%	5	10,64%
	homozygot	-	-	-	-
c.150G>T	gesamt	1	0,52%	-	-
	heterozygot	1	0,52%	-	-
	homozygot	-	-	-	-
c.638C>T	gesamt	2	1,03%	-	-
	heterozygot	2	1,03%	-	-
	homozygot	-	-	-	-
c.693T>C	gesamt	1	0,52%	-	-
	heterozygot	1	0,52%	-	-
	homozygot	-	-	-	-
c.828C>T	gesamt	132	68,04%	24	51,06%
	heterozygot	114	58,76%	19	40,43%
	homozygot	18	9,28%	5	10,64%
c.1014G>C	gesamt	130	67,01%	24	51,06%
	heterozygot	111	57,22%	19	40,43%
	homozygot	19	9,79%	5	10,64%
c.1094G>A	gesamt	104	53,61%	23	48,94%
	heterozygot	96	49,48%	18	38,30%
	homozygot	8	4,12%	5	10,64%
c.1325C>T	gesamt	1	0,51%	-	-
	heterozygot	1	0,51%	-	-
	homozygot	-	-	-	-

Tab. 13: Auflistung aller gefundenen Besonderheiten im Desmin-Gen bei HCM-Patienten.

Exon	Variations ID	Variante	Triplet	Frequenz		SNP
1	rs1318299	c.75A>G	CCA>CCG	Pro25Pro	Known	sSNP
1	rs2017800	c.93T>C	AGT>AGC	Ser31Ser	Known	sSNP
1	GA002799	c.408C>T	CTC>CTT	Leu136Leu	Known	sSNP
1		c.150G>T	ACG>ACT	Thr50Thr	Unknown	sSNP
2	rs41272699	c.638C>T	GCG>GTG	Ala213Val	Known	nsSNP
3		c.693T>C	TCT>TCC	Ser231Ser	Unknown	sSNP
4	rs1058261	c.828C>T	GAC>GAT	Asp276Asp	Known	sSNP
5	rs12920	c.1014G>C	CTG>CTC	Leu338Leu	Known	sSNP
6	rs1058284	c.1094G>A	GCG>GCA	Ala368Ala	Known	sSNP
8		c.1325C>T	ACC>ATC	Thr442Ile	Known	Mutation

Tab. 14: Auflistung aller gefundenen Varianten mit dem entsprechenden Exon und, falls vorhanden, der Variations ID.

4. Diskussion

4.1 Überblick

In dieser Arbeit wurden 194 HCM- und 47 NC-Patienten auf Besonderheiten im Desmin-Gen untersucht mit dem Ziel genetische Varianten zu finden, die mit der Erkrankung in Zusammenhang stehen. Dazu wurden bei den Patienten alle neun kodierenden Exons systematisch sequenziert und ausgewertet. In Exon 8 wurde bei einem HCM-Patienten die bekannte Missense-Mutation Thr442Ile gefunden. Eine nsSNP, welche bereits in der Datenbank ensembl.org erfasst war, fand sich in Exon 2 bei zwei HCM-Patienten. Außerdem wurden bekannte und unbekannte sSNPs in den Exons 1, 3, 4, 5 und 6 bei den HCM-Patienten und den Exons 1, 4, 5 und 6 bei den NC-Patienten gefunden.

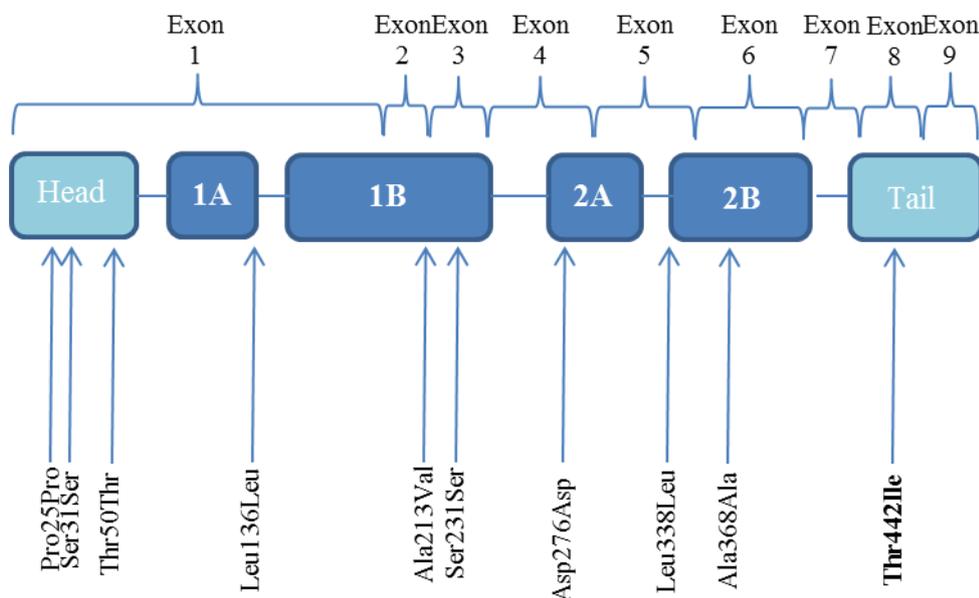


Abb. 40: Schematische Darstellung der Lokalisationen der gefundenen SNPs und der Mutation (fett) im Gen.

4.2 Methoden

Die hier durchgeführte automatische Sequenzierung nach Sanger gilt als die sensitivste und effektivste Methode des Mutationsscreenings. Das hier verwendete Gerät ABI Prism 3100 Avant erkennt die Basen laut Herstellerangabe mit einer Genauigkeit von 98,5%. Diese Zahl ist allerdings nur in einem begrenzten Frequenzlängenbereich gültig, nämlich zwischen 27 und 576 bp.

Aus den Tabellen 13 und 14 geht hervor, dass die Produkte der Primerpaare DES 2/3, 6, 7 und 8 innerhalb dieser Größenordnung liegen.

Im Falle von Exon 1 ließ sich die erste Exonhälfte durch Vorwärtssequenzierung, die zweite Exonhälfte durch Rückwärtssequenzierung gut darstellen, so dass durch Sequenzieren in beide Richtungen das gesamte Exon ausgewertet werden konnte. Das Produkt des Primerpaars DES 4/5 überschreitet in seiner Länge zwar ebenfalls den Idealbereich, liefert aber im Bereich von Exon 4 durch Rückwärts- und im Bereich von Exon 5 durch Vorwärtssequenzierung so ein klares Ergebnis, dass es bei diesem Primerpaar belassen wurde. Das längere Produkt bei Exon 9 stellt insofern kein Problem dar, da zwischen Exonbeginn und Stoppcodon nur 39 bp liegen.

In allen Fällen ist der Abstand der Forward Primer zum Exonbeginn und der Reverse Primer zum Exonende größer als 27 bp.

Es kann daher von einer großen Genauigkeit der Ergebnisse dieser Arbeit ausgegangen werden.

4.3 Prävalenz der Varianten

4.3.1 sSNPs

Da es bei den synonymen Variationen zu keiner Änderung in der Aminosäuresequenz kommt und sich somit das entstehende Protein nicht ändert, kann man davon ausgehen, dass diese keine Bedeutung für die Pathogenese von HCM und NC haben. Da hier allerdings einige sSNPs auffallend häufig auftraten, wurden ihre Prävalenzen mit Hilfe der Datenbank www.ensembl.org mit denen von Referenzpopulationen verglichen.

Rs1318299 und rs2017800, die beiden synonymen SNPs in Exon 1, die bei allen Patienten beider Gruppen vorkommen und nur in einigen wenigen Fällen heterozygot sind, kommen auch

bei 125 anderen Personen zu über 99% vor. Die Überlegung liegt daher nahe, ob es sich in diesen beiden Fällen wirklich um ein SNP handelt oder vielmehr die Referenz-DNA an Position c.75 von A auf G und an Position c.93 von T auf C geändert werden sollte.

Die Variationen rs1058261 in Exon 4, rs12920 in Exon 5 und rs1058284 in Exon 6 zeigt sich ebenfalls in ähnlichen prozentualen Anteilen bei HCM-Patienten, NC-Patienten und den Vergleichsgruppen aus ensembl.org. Der Teil der Homozygoten beträgt dabei bei allen Gruppen um 10%. Das Vorkommen von Heterozygoten verteilt sich zwischen 40 und 60%. Es ist bereits bekannt, dass es im Falle aller drei Varianten Unterschiede in der Prävalenz bei Afrikanern, Asiaten und Europäern gibt.

Rs111828114 zeigte sich in dieser Arbeit heterozygot bei ca. 10% der HCM- und der NC-Patienten, bei ensembl.org bei 3,7% der 1307 Vergleichspatienten.

Unter den HCM-Patienten fanden sich außerdem Thr50Thr und Ser231Ser, zwei bisher nicht beschriebene, synonyme Varianten, die jeweils bei einer Person auftauchten.

4.3.2 nsSNP

Der nsSNP rs41272699, tauchte bei zwei HCM-Patienten auf. Dies entspricht ca. 1% der Proben. In zwei bei www.ensembl.org aufgeführten Kohorten von 60 bzw. 2275 Gesunden wurde an der Position c.638 zu 96,7% bzw. 99,1% die Base Cytosin und zu 3,3% bzw 0,9% die Base Thymin gefunden. In dem hiesigen Fall mit 194 Patienten, also 388 Chromosomen, von denen zwei ein T an Position c.638 tragen, ergibt dies eine Verteilung von 99,5% Cytosin und 0,5% Thymin. Dieser Basenaustausch ist also hier noch seltener als in den beiden Kontrollgruppen. Somit kann davon ausgegangen werden, dass er, obwohl es sich um ein nsSNP handelt, nichts mit der Pathogenese der HCM zu tun hat.

4.4 Familie A

Von dem Indexpatienten A1-1, bei welchem die Missense-Mutation Thr442Ile in Exon 8 entdeckt wurde, konnte, wie bereits in 3.3 beschrieben, die DNA eines Teil seiner Familie ebenfalls auf diese Mutation untersucht werden.

Bei zwei der Söhne (A2-1, A2-2) wurde diese ebenfalls gefunden, die Frau und Sohn 2267 entsprachen dem Wildtyp.

Dies passt zu den klinischen Daten:

Der Indexpatient selbst synkopierte erstmalig im Alter von 28 Jahren, woraufhin eine konzentrische Myokardhypertrophie festgestellt wurde. Die echokardiographische Beurteilung der Klappenfunktionen und der systolischen LV-Funktion sowie regelmäßige Blutdruckmessungen und eine Koronarangiographie zeigten keine pathologischen Befunde. Mit 33 Jahren beobachtete der Patient eine erschwerte Hüftbeugung als Erstsymptom einer Myopathie. Die daraufhin gemessenen CK-Werte waren ca. um das 3-fache des Normwertes erhöht. Im Alter von 41 Jahren traten Belastungsdyspnoe und pektanginöse Beschwerden auf. Es wurde ein AV-Block III° diagnostiziert und daraufhin ein ICD implantiert, zumal anamnestisch der plötzliche Herztod seines Vaters mit 44 Jahren bekannt wurde. Die symptomatische Behandlung mit β -Blockern erfolgte ab dem 47 Lebensjahr zur Linderung der Belastungsdyspnoe und der pektanginösen Beschwerden. Regelmäßige echokardiographische Kontrollen in den folgenden 10 Jahren zeigten nicht größenprogrediente Septum- und Hinterwanddicken von 15 mm. Im Gegensatz dazu kam es aber zu einer Progredienz der Myopathie, durch welche der Patient ab dem 54 Lebensjahr überwiegend auf einen Rollstuhl angewiesen war.

Das erste Hypertrophiezeichen seines ältesten Sohns (A2-1) war ein auffälliges EKG im Alter von 12 Jahren. Mit 20 Jahren war dieses schon deutlich pathologisch inkomplettem Rechtsschenkelblock, ausgeprägten terminalen T-Negativierungen und deszendierenden ST-Senkungen in II, III, aVF und V4-V6. Zu diesem Zeitpunkt wurde die Diagnose einer asymptomatischen, hypertrophen, nicht obstruktiven CM mit nur gering erhöhten enddiastolischen Wanddicken gestellt. Erstes symptomatisches Zeichen für eine Myopathie war die Fußheberschwäche, die dem Patienten mit 32 Jahren auffiel. Zu diesem Zeitpunkt waren die CK-Werte, welche sieben Jahre zuvor ca. 2,5-fach erhöht waren, auf des ca. 11-fache des

Normwertes angestiegen. Bisher sind weder Synkopen noch signifikante Arrhythmien bei diesem Patienten aufgetreten.

Die Diagnosestellung der HCM bei seinem jüngeren Bruder (A2-2), also dem mittleren Sohn des Indexpatienten erfolgte mit 26 Jahren. Bei echokardiographisch unauffälligen Wanddicken zeigte sich eine Relaxationstörung und außerdem ein pathologisches EKG mit T-Negativierungen (Amplitude max. -0,7 mV) in I, II, III, aVF, V2-V6, ST-Hebungen in V2-3 (bis 0.25mV) sowie breiten biphasische P-Wellen in V1-V2. Im neurologischen Status fiel eine Zehenheberparese links auf. Außerdem lagen ca. 5,5-fach erhöhte CK-Werte vor. Subjektiv war der Patient sowohl kardiopulmonal als auch neurologisch beschwerdefrei und belastbar.

Beim jüngsten der drei Brüder (A2-3) lagen im Alter von 20 Jahren bei normalen CK-Werten weder auffällige kardiologische noch neurologische Untersuchungsergebnisse vor.

Anamnestisch ist neben dem plötzlichen Herztod des Vaters des Indexpatienten (A0-1) mit 44 Jahren das Versterben eines Bruders des Indexpatienten (A1-3) im Alter von 42 Jahren, ebenfalls durch plötzlichen Herztod bekannt. Außerdem soll dessen Sohn (A2-4) ebenfalls an einer HCM sowie einer Myopathie leiden.

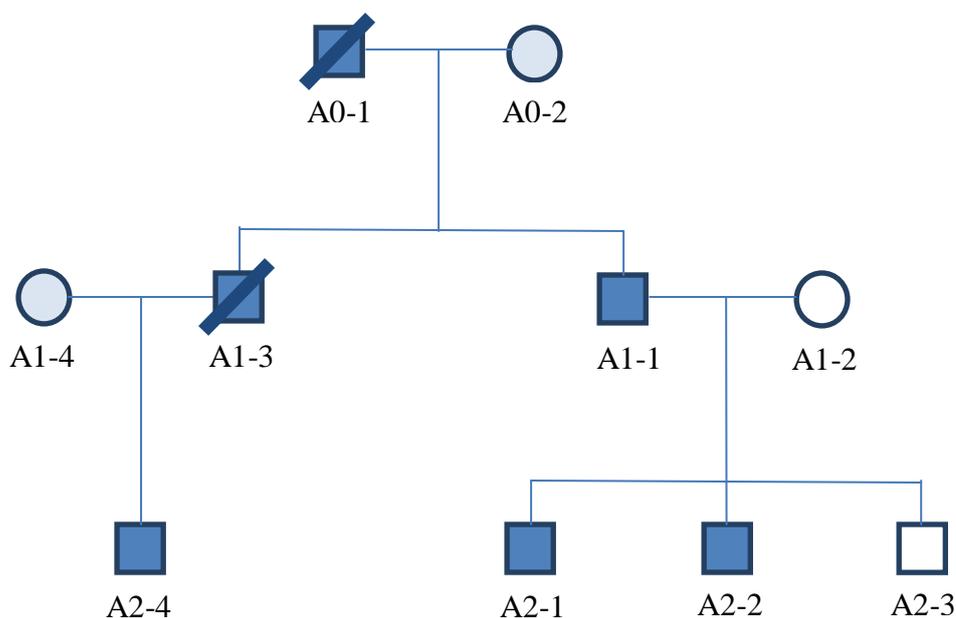


Abb. 41: Stammbaum der untersuchten Familie A inclusive des nur anamnestisch bekannten Vaters (A0-1), Bruders (A1-3) und Neffen (A2-4) des Indexpatienten sowie seiner Mutter (A0-2) und seiner Schwägerin (A1-4).

■ = männlich, erkrankt. ■ (mit Diagonale) = männlich, erkrankt, verstorben. □ = männlich, gesund.
 ○ = weiblich, gesund. ○ (mit Diagonale) = weiblich, keine Befunde bekannt.

Eine weitere Familie mit der Mutation Thr442Ile wurde in einer Arbeit von Bär et al.²⁵ beschrieben. Es handelt sich hier um eine französische Familie, bei der in drei Generationen bei sechs Personen eine fortschreitende Myopathie und CM diagnostiziert wurde oder vermutet wird. Es handelt sich um die Mutter, ihre drei Töchter und eine Enkelin und einen Enkel, welche keine Geschwister sind. Genauere Daten liegen nur zu den beiden letzteren vor. Bei ihm machte sich die Erkrankung im Alter von 35 Jahren bemerkbar mit gelegentlicher Dyspnoe und Kraftlosigkeit in den unteren Extremitäten, die sich bald bis in die oberen ausbreitete.

Drei weitere, nicht verwandte Patienten trugen ebenfalls diese Mutation, allerdings ohne familiär auftretende Myopathien²⁵.

Da im Falle der oben beschriebenen Familien die Erkrankung in jeder Generation auftaucht und die Kranken heterozygote Mutationsträger sind, handelt es sich bei Thr442Ile um eine dominant vererbte Mutation.

Aufgrund des enorm erhöhten Risikos eines plötzlichen Herztods bei HCM, insbesondere bei jungen Sportlern, sollte in diesen Fällen, mit bekannter ursächlicher Mutation, den Verwandten ersten Grades und Verwandten zweiten Grades, welche Sportler sind, zu einem genetischen Test geraten werden. Das Ausmaß dieser familiären Screenings sollte davon bestimmt werden, ob es sich um ein sporadisches Auftreten der Mutation beim Indexpatienten handelt, oder ob bereits ein Elternteil betroffen ist. In jedem Familienzweig sind dann keine weiteren Tests in folgenden Generationen mehr notwendig, wenn die Eltern beide negativ sind²⁶.

4.5 Phänotypische Auswirkung von Desmin-Mutationen

In der hier untersuchten Familie A zeigt sich die Tendenz einer im Vordergrund stehenden CM mit begleitender skeletaler Myopathie.

Wie die in 1.4.4 aufgelisteten Desmin-assoziierten Krankheitsbilder bereits erkennen lassen, können Mutationen im Desmin-Gen eine weite Bandbreite an Phänotypen hervorrufen.

In einer Arbeit von Kostera-Pruszyk et al. wurden die klinischen Daten von 92 Patienten mit einer molekular nachweisbaren Desminopathie zusammengetragen²⁴. Bei 73% konnte eine kardiologische Beteiligung festgestellt werden, bei 38% war dies sogar die Erstmanifestation und das Hauptleiden oder gar die einzige Manifestation. Von diesen Patienten unterzogen sich 47

weiteren Untersuchungen, welche auch eine Echokardiographie beinhalteten. Man kam zu folgendem Ergebnis:

DCM – 57%

RCM – 28%

HCM – 15% ²⁴

Zusätzlich konnten häufig atrioventrikuläre Leitungsstörungen beobachtet werden, welche sich durch den Desminreichtum des Herzleitungssystems erklären lassen.

Die Unterschiede in den Phänotypen erklärt man sich durch die die Art der Mutation und v.a. der Lokalisation im Gen, welche sich auf die Anordnung der Filamente auswirkt. So zeigten sich folgende Zusammenhänge:

Mutation in 1B- oder tail-Domäne – v.a. kardiale Auswirkungen

Mutation in 2B-Domäne – v.a. Auswirkungen auf Skelett-Muskel ²⁴

Wie in Abbildung 40 ersichtlich ist, befindet sich die Mutation Thr442Ile in der tail-Domäne des Gens.

Einen weiteren Einfluss auf den Phänotyp können andere Intermediärfilamente und deren Zusammenspiel mit Desmin haben ²⁴. Beispielsweise wird in einer Arbeit von Chourbagi et al. gezeigt, dass das desmin-assoziierte Typ IV Intermediärfilament-Protein Synemin bei bestimmten Desmin-Mutationen die Desmin-Struktur verbessert und die Bildung von Aggregaten verringert ²⁷. Es handelt sich dabei um die Mutationen, welche filamentöse Strukturen ausbilden können. Hierzu zählt auch die hier gefundene Mutation Thr442Ile ²⁷.

Außerdem hängt es von der Aktivität der Chaperone ab, wie gut die Auswirkungen der Desmin-Mutation kompensiert werden können und somit, wie stark sie sich klinisch auswirken können ²⁴.

4.6 Konservierung

Desmin ist ein hoch konserviertes Protein, was bedeutet. Im untenstehenden Ausschnitt sieht man, dass die Sequenz unter den Säugetieren kaum variiert. Auch beim Zebrafisch variiert diese nur mäßig. Auch in den hier nicht abgebildeten Abschnitten AA 1 – AA 392 und AA 435 – AA 468 zeigt sich ein vergleichbares Bild. An der Position, an der sich die hier gefundene Mutation Thr442Ile befindet, steht bei allen aufgeführten Säugetieren die Aminosäure Threonin. Beim Zebrafisch taucht anstelle dessen Serin auf, welches wie Threonin neutral ist und ähnliche elektrische Eigenschaften aufweist.

Eine hohe Konservierung ist als Zeichen für die große Bedeutung eines Proteins zu verstehen, da spontane Mutationen in der Evolution sich bei der natürlichen Selektion nicht durchsetzen und weitervererbt werden konnten. Hieraus kann man schließen, dass eine Missense-Mutation im Desmin-Gen, wie Thr442Ile, gravierende Funktionsänderungen des Proteins zur Folge haben kann.

		442	
		↓	
Homo sapiens	393	NVKMALDVEIATYRKLEGEESRINLP	Q TYSALNFRETSPE-----434
Pan troglodytes (Schimpanse)	393	NVKMALDVEIATYRKLEGEESRINLP	Q TYSALNFRETSPE-----434
Canis lupus (Hund)	392	NVKMALDVEIATYRKLEGEESRINLP	Q TYSALNFRETSPE-----433
Bos taurus (Kuh)	393	NVKMALDVEIATYRKLEGEESRINLP	Q TFSALNFRETSPE-----434
Mus musculus (Maus)	392	NVKMALDVEIATYRKLEGEESRINLP	Q TFSALNFRETSPE-----433
Demodex norvegicus (Ratte)	392	NVKMALDVEIATYRKLEGEESRINLP	Q TFSALNFRETSPE-----433
Danio rerio (Zebrafisch)	387	NVKMALDVEIATYRKLEGEESRISLP	Q S FSSLSFRESSPEQH436

Abb. 42: Ausschnitt der Aminosäure-Sequenzen des Desmin bei Mensch, Schimpanse, Hund, Kuh, Maus, Wanderratte und Zebrafisch. Grün unterlegt ist die Position an der sich der hier gefundene Aminosäureaustausch befindet. Beim Menschen entspricht dies der 442. Aminosäure.

4.7 Bedeutung der Desmin-Mutation in der Pathogenese

Das histologische Korrelat der Desminopathien sind intra- und subsarkolemmal gelegene Ansammlungen von überschüssigem Material, welches sich genauer als Desmin-Aggregate sowie solchen von Desmin-assoziierten Proteinen definieren lässt. Auch wenn die genaueren Pathomechanismen schwer fassbar sind, ist deutlich, dass die Aggregate im Wild-Type-Desmin-Muskel weitaus weniger vorliegen als im Muskel von Desminopathie-Patienten.

Dies lässt folgende Schlüsse zu: Ein Problem stellt die Entsorgung der falsch gefalteten Desmin-Dimere dar. Ein weiteres ist der Abbau von fehlerhaft aufgebauten Filamenten. Folglich spielt das proteolytische System der Zelle eine zentrale Rolle bei der Pathogenese, was auch dadurch deutlich wird, dass sich in einer Studie von Kumarapeli und Wang zeigte, dass eine erhöhte zelluläre Produktion von Wild-Type-Desmin durchaus von der Zelle toleriert werden kann, ohne dass es zu einem pathologischen Effekt kommt²⁸. Der ausschlaggebende Unterschied scheint auf filamentärer Ebene zu liegen. Dass diese sich auch unter den verschiedenen nsSNPs unterscheiden zeigten Bär et al. in Versuchen mit 14 Desmin-Missense-Mutationen. Hierbei wurden unterschiedliche Effekte auf Filamentanordnung und Netzwerkbildung in vivo und in vitro beobachtet. Bei der Mutation Thr442Ile zeigten sich in einer Muskelbiopsie eines Mutationsträgers zwischen den einzelnen Myofibrillen eine reiche Ansammlung von elektronendichtem Material. Im In-vitro-assembly-assay, einer wichtigen Methode um Mutationen als potentiell krankheits-assoziiert oder nicht einzuordnen, bei der elektronenmikroskopisch nach 10 s, 5 min und 1 h die Ausbildung von Strukturen im Vergleich zum Wild-Typ kontrolliert werden, zeigte T442I allerdings reguläre, mit dem Wild-Typ vergleichbare Filamente. Allerdings wies dieses Endprodukt eine ca. dreifach so hohe Viskosität auf wie das des Wild-Typ-Desmins²⁵.

4.8 Weiterführende Untersuchungen

Wie zuvor diskutiert liegen im Falle der Desmin-Mutation Thr442Ile verschiedene Sachverhalte vor. Einerseits zeigt die Untersuchung der Familien einen deutlichen Zusammenhang zwischen dem Vorhandensein der Mutation und dem Entstehen einer Desminopathie, welche auch mit dem immunhistochemischen Befund der Muskelbiopsie bei Einzelpersonen zusammen passt. Andererseits lässt sich im In-vitro-assembly-assay kein pathologisches Formierungs-Muster erkennen, außer der erhöhten Endviskosität²⁵.

Dies führt zu der Vermutung, dass bei dem Prozess der Aggregats-Bildung weitere zelluläre Mechanismen und Zusammenspiele eine entscheidende Rolle spielen. Um diese zu erschließen müssen tiefere Erkenntnisse über Vernetzung des Desmin-Systems mit anderen Zellbestandteilen und den verschiedenen zellulären Signalübertragungswegen erlangt werden. Ein guter möglicher Ansatzpunkt wäre die genauere Untersuchung von α B-Crystallin, Bestandteilen der Z-Scheibe oder Proteinen der muskulären Signal-Kaskaden sowie des muskelspezifischen proteolytischen Systems. Das exakte Verständnis dieser Zusammenspiele wird nicht nur die genaue Pathogenese von Desminopathien nachvollziehbarer machen, sondern im Idealfall auch Optionen eröffnen für die Entwicklung neuer spezifischer Therapien²⁵.

5. Zusammenfassung

Als Kardiomyopathien (CM) bezeichnet man vom Herzmuskel ausgehende Erkrankungen, welche man auf verschiedene Arten anhand ihrer Entstehung unterteilen kann. Die beiden hier behandelten CM, die Hypertrophe (HCM) und die Non-Compaction-Kardiomyopathie (NC), gehören zu den familiären, also genetisch bedingten CM.

Während bei der HCM eine Verdickung des Herzmuskels, meist im linksventrikulären Abschnitt, vorliegt und dadurch ein vermindertes intraventrikuläres Volumen und, im Falle einer HOCM, eine Obstruktion der Ausflussbahn, besteht das Problem der NC in der schwammartigen Struktur des Muskelgewebes und des damit verbundenen Funktionsverlusts. Die wichtigsten bereits bekannten ursächlichen Mutationen befinden sich bei der HCM im β -Myosin und Myosin bindenden Protein-C und bei der NC in Myosin. Trotzdem gibt es viele Fälle, bei denen keine Mutation in einem der bekannten Genen nachgewiesen werden konnte.

Im Intermediärfüllament ist Desmin ein sehr zugfestes Protein, das in allen Muskelzellen vorkommt und dort als Stützgerüst dient. Einige Erkrankungen konnte bereits mit Mutationen in diesem Gen in Verbindung gebracht werden.

Ziel der Arbeit ist eine systematische Untersuchung einer großen Gruppe an HCM-Patienten auf Mutationen im Desmin-Gen zur Erweiterung der Datenlage. Des Weiteren soll die Frage beantwortet werden, ob ein Zusammenhang zwischen Mutationen im Desmin-Gen und der Pathogenese von NC besteht.

Hierzu wurde die DNA von 194 HCM- und 47 NC- Patienten untersucht indem zuerst mittels PCR die einzelnen Exons amplifiziert wurden, zu welchen in der anschließenden Sequenzierung ein Komplementärstrang aus farbstoffmarkierten ddNTPs erzeugt wurde. Diese wurden mittels Elektrophorese- und Fluoreszenz-Detektion im ABI 3100 Avant in ein Elektropherogramm umgeschrieben, welches sich mit dem Programm Sequencher 4.1 auswerten ließ.

Hierbei fanden sich acht synonyme SNPs und ein nicht krankheitsrelevanter nicht-synonymer SNP. Das wichtigste Ergebnis zeigte sich jedoch in Exon 8 eines HCM-Patienten. Es handelt sich um die Mutation c.1325C>T (Thr442Ile), die bereits bekannt ist. Es war möglich, vier Personen aus der Familie dieses Patienten ebenfalls auf diese Mutation zu untersuchen: seine Frau und einer seiner Söhne wiesen die Mutation nicht auf. Zwei seiner Söhne, die, wie ihr Vater, erkrankt sind, jedoch schon. Der Genotyp kosegregiert also mit dem Phänotyp. Klinisch steht in dieser Familie die Kardiomyopathie im Vordergrund. Das histologische Korrelat der Desminopathien ist eine subsarkolemmale Aggregation von Desmin und Desmin-assoziierten

Proteinen. Diese konnten in einer anderen Studie in Muskelbiopsien bei T442I-Trägern elektronenmikroskopisch nachgewiesen werden.

Desmin ist also ein seltenes HCM-assoziiertes Gen.

6. Literaturverzeichnis

1. Maron BJ. Is the 2006 American Heart Association classification of cardiomyopathies the gold standard?: The 2006 American Heart Association Classification of Cardiomyopathies Is the Gold Standard. *Circulation, Journal of American Heart Association: Heart Failure* 2008;1;72-76
2. Maron BJ, et. al. Contemporary Definitions and Classification of the Cardiomyopathies: An American Heart Association Scientific Statement from the Council on Clinical Cardiology, Heart Failure and Transplantation Committee; Quality of Care and Outcomes Research and Functional Genomics and Translational Biology Interdisciplinary Working Groups; and Council on Epidemiology and Prevention. *Circulation, Journal of American Heart Association* 2006; March:1807-1815
3. Elliott P, Andersson B, Arbustini E, Bilinska Z, Cecchi F, Charron P, Dubourg O, Kühl U, Maisch B, McKenna WJ, Monserrat L, Pankuweit S, Rapezzi C, Seferovic P, Tavazzi L, Keren A. Classification of the cardiomyopathies: a position statement from the european society of cardiology working group on myocardial and pericardial diseases, *European Heart Journal* 2008;29;270–276
4. Elliott P. Is the 2006 American Heart Association classification of cardiomyopathies the gold standard? The 2006 American Heart Association Classification of Cardiomyopathies Is Not the Gold Standard. *Circulation: Heart Failure* 2008;1;77-80
5. Elliott P, McKenna WJ. Hypertrophic cardiomyopathy. *Lancet* 2004;363;1881-91
6. Chung MW, Tsoutsman T, Semsarian C. Hypertrophic cardiomyopathy: from gene defect to clinical disease. *Cell Research* 2003;13;9–20
7. Kelly M, Semsarian C. Multiple Mutations in Genetic Cardiovascular Disease: A Marker of Disease Severity? *Circ Cardiovasc Genet* 2009;2;182-190

8. Kumar, et al. Pathologie of Cardiomyopathy. Robbins Basic Pathology 8e. Elviser. (Accessed October 10, 2009 http://2.bp.blogspot.com/_cPZuJy9YXG8/SbT73XoqpGI/AAAAAAAAABE/TvykNUg8f8c/s400/cardiomyopathy.JPG)
9. Adabag AS, Maron BJ, Appelbaum E, et al. Occurrence and frequency of arrhythmias in hypertrophic cardiomyopathie in relation to delayed enhancement on cardiovascular magnetic resonance. *J Am Coll Cardiol.* 2008; 51:1369-74.
10. Ommen SR, Nishimura RA. Hypertrophic Cardiomyopathy. *Curr Probl Cardiol* 2004; May:239-291
11. Elliott P. Investigation and treatment of hypertrophic cardiomyopathy. *Clin Med* 2007;7;383–7
12. Pantazis AA, Elliott PM. Left ventricular noncompaction. *Current Opinion in Cardiology* 2009;24;209–213
13. Jenni R, Oechslin EN, van der Loo B. Isolated ventricular non-compaction of the myocardium in adults. *Heart* 2007;93;11-15
14. Engberding R, Stöllberger C, Ong P, Yelbuz TM, Gerecke BJ, Breithardt G. Isolated Non-Compaction Cardiomyopathy. *Deutsches Ärzteblatt Int* 2010;107(12);206–13
15. Herold G, Mitarbeiter. *Innere Medizin.* 2010. Verlag Arzt + Information.
16. McNally E, Dellefave L. Sarcomere Mutations in Cardiogenesis and Ventricular Noncompaction. *Trends Cardiovasc Med* 2009;19;17–21
17. Lüllmann-Rauch R. *Taschenlehrbuch Histologie.* Thieme. 2.Auflage
18. Mavroidis M, Panagopoulou P, Kostavasili I, Weisleder N, Capetanaki Y. A missense mutation in desmin tail domain linked to human dilated cardiomyopathy promotes cleavage of the head domain and abolishes its Z-disc localization. *The FASEB Journal* article fj.07-088724. Published online June 6, 2008. Vol22.Sept08

19. Paulin D, Huet A, Khanamyrian L, Xue Z. Desminopathies in muscle disease. *J Pathol.* 2004; 204;418–427
20. Bär H, Mücke N, Ringler P, Müller SA, Kreplak L, Katus HA, Aebi U, Herrmann H. Impact of Disease Mutations on the Desmin Filament Assembly Process. *J. Mol. Biol.* 2006;360;1031–1042
21. Goldfarb LG, Vicart P, Goebel HH, Dalakas MC. Desmin myopathy. *Brain Advance Access.* DOI: 10.1093/brain/awh033
22. Maass K, Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy and Desmin: Another gene fits the shoe. *Heart Rhythm, Vol 7, No 8, August 2010,1065-1066*
23. Li D, Tapscoft T, Gonzalez O, Burch PE, Quiñones MA, Zoghbi WA, Hill R, Bachinski LL, Mann DL, Roberts R. Desmin Mutation Responsible for Idiopathic Dilated Cardiomyopathy. *Circulation.* 1999;100;461-464
24. Kostera-Pruszczyk A, Pruszczyk P, Kamińska A, Lee HS, Goldfarb LG. Diversity of cardiomyopathy phenotypes caused by mutations in desmin. *Int J Cardiol* 2007,doi:10.1016/j.ijcard.2007.08.095
25. Bär H, Goudeau B, Wälde S, Casteras-Simon M, Mücke N, Shatunov A, Goldberg YP, Clarke C, Holton JL, Eymard B, Katus HA, Fardeau M, Goldfarb L, Vicart P, Herrmann H. Conspicuous Involvement of Desmin Tail Mutations in Diverse Cardiac and Skeletal Myopathies. *Human Mutation* 2007;0,1-13
26. Bos JM, Towbin JA, Ackerman MJ. Diagnostic, Prognostic, and Therapeutic Implications of Genetic Testing for Hypertrophic Cardiomyopathy. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2009;54;201-211
27. Chourbagi O, Bruston F, Carinci M, Xue Z, Vicart P, Paulin D, Agbulut O. Desmin mutations in the terminal consensus motif prevent synemin-desmin heteropolymer filament assembly. *ExperimentalCellResearch* 2011;318;886–897

28. Kumarapeli ARK, Wang X. Genetic modification of the heart: chaperones and the cytoskeleton. *J Mol Cell Cardiol.* 2004; 37:1097–1109

Danksagung

Mein Dank für die überaus gute Betreuung dieser Arbeit gilt in erster Linie PD Dr. Cemil Özcelik, der mir mit seiner stets positiven, engagierten und menschlichen Art über jedes Motivationstief hinweg geholfen hat, und dem gesamten Team des Kardiogenetischen Labors des ECRC, besonders Andrea Behm und Andreas Perrot, die immer mit einem Höchstmaß an Geduld zur Lösung meiner unzähligen technischen und biochemischen Fragen und Probleme beigetragen haben. Außerdem danke ich Dr. Christian Geier für seine Beratung und Unterstützung.

Lebenslauf

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

Selbstständigkeitserklärung

„Ich, Nadja Eckert, geboren am 20.06.1986 in Bad Friedrichshall, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Die Bedeutung von Mutationen im Desmin-Gen bei der Pathogenese von Hypertropher Kardiomyopathie und Non-Compaction Kardiomyopathie“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Datum

Unterschrift