

Aus der Medizinischen Klinik für
Molekulare und Klinische Kardiologie
der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Die Identifizierung und Charakterisierung von neuen
Kardiomyopathie-Genen**

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Arnd Heuser

aus Marl

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. L. Thierfelder
2. Prof. Dr. med. H. Drexler
3. Prof. Dr. G. Ertl

Datum der Promotion: 22.02.2008

Inhalt

Die Identifizierung und Charakterisierung von neuen Kardiomyopathie-Genen	1
Abkürzungsverzeichnis	4
Zusammenfassung	6
Einleitung	7
Kardiomyopathien	7
Arrhythmogene rechtsventrikuläre Kardiomyopathie	7
Dilatative Kardiomyopathie	8
Zielstellung	9
Arrhythmogene rechtsventrikuläre Kardiomyopathie	9
Dilatative Kardiomyopathie	9
Material und Methoden	10
Arrhythmogene rechtsventrikuläre Kardiomyopathie	10
Dilatative Kardiomyopathie	12
Ergebnisse	13
Arrhythmogene rechtsventrikuläre Kardiomyopathie	13
Dilatative Kardiomyopathie	18
Diskussion	21
Arrhythmogene rechtsventrikuläre Kardiomyopathie	21
Dilatative Kardiomyopathie	24
Publikationsverzeichnis	27
Zitierte Publikationen	27
Eigene Publikationen	32
Danksagung	33
Eidesstattliche Erklärung	34
Erklärung über den Anteil an den Publikationen	35
Lebenslauf	36

Abkürzungsverzeichnis

µm	Mikrometer
aa	Aminosäuren
ARVC	Arrhythmogene rechtsventrikuläre Kardiomyopathie
bp	Basenpaare
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
DCM	Dilatative Kardiomyopathie
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DSP	Desmoplakin
DSC	Desmocollin
DSG	Desmoglein
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetracetat
EKG	Elektrokardiogramm
FCS	Fetal Calf Serum
g	Fallbeschleunigung
HE	Hämatoxylin/Eosin
HRP	Meerrettich-Peroxidase
hpf	Hours post-fertilization
ICD	Implantierbarer Kardioverter-Defibrillator
IF	Intermediärfilamente
JUP	Plakoglobin
Kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
LOD	Logarithm of the odds
M	mol/ Liter
mRNA	messenger RNA
MB	Megabasen
MO	Morpholino
MRT	Magnetresonanztomograph
MW	Molekulargewicht
N-Cadherin	Neuronales-Cadherin

OD	Optische Dichte
PBS	Phosphate-buffered Saline
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
PKP	Plakophilin
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse-Transkriptions-PCR
RT-Polymerase	Reverse-Transkriptase-Polymerase
RYR2	Kardialer Ryanodinrezeptor
w/v	Masse pro Volumen
WT	Wildtyp

Maßeinheiten wurden entsprechend der Nomenklatur des SI (Système international) angegeben.

Zusammenfassung

Die arrhythmogene rechtsventrikuläre Kardiomyopathie (ARVC) ist gekennzeichnet durch einen progressiven Ersatz der rechtsventrikulären Kardiomyozyten durch Fett- und Bindegewebe. Diese pathologischen Veränderungen können zu ventrikulären Tachyarrhythmien und zum plötzlichen Herztod führen.

Wir konnten im humanen Plakophilin-2 Gen (PKP2) bei 120 nicht verwandten ARVC Patienten 32 heterozygote Mutationen identifizieren. Plakophilin-2 ist ein essenzieller Bestandteil des Desmosoms. Die kardialen Desmosomen gewährleisten die mechanische Stabilität des Herzmuskels und übertragen die Kraft des kontraktiven Apparates. Zusätzlich können sie an der Signaltransduktion der Kardiomyozyten teilnehmen. Die Mehrzahl der identifizierten Mutationen führen zur Insertion von verfrühten Stopp-Kodons. Kardiale Expressionsanalysen von Herzbiopsien zeigen sowohl das Fehlen eines trunkeierten Proteins als auch eine deutliche Reduktion des PKP2-Wildtypproteins. Weiterhin konnten wir eine Mutation in Intron 5 (c.631-2A→G) im Gen des desmosomalen Cadherin Desmocollin 2 (DSC2) identifizieren, welche zu einer kryptischen Spleiß-Akzeptorstelle und zu einem verfrühten Stopp-Kodon führt. Quantitative Analysen ergaben, dass die kardiale DSC2-Expression deutlich verringert ist, bei gleichzeitigem Fehlen des mutierten Transkriptes. Der Morpholino-Knockdown des DSC2-Orthologs im Zebrafisch führt zur Reduzierung der desmosomalen Plaque-Fläche, zum Verlust der extrazellulär gelegenen elektronendichten desmosomalen Mittellinie und ist mit kardialen Kontraktilitätsstörungen assoziiert. Die Knockdown-Experimente belegen die Notwendigkeit von DSC2 für die normale Herzentwicklung und Funktion.

Des Weiteren gelang es uns, einen neuen Locus für die dilatative Kardiomyopathie (DCM) mit diffuser myokardialer Fibrose und plötzlichem Herztod auf Chromosom 10q25-q26 nachzuweisen. Die Identifizierung des verantwortlichen Krankheitsgens in diesem Intervall könnte wichtige Hinweise geben auf die zu Grunde liegenden Pathomechanismen von DCM und plötzlichem Herztod.

Einleitung

Kardiomyopathien

Kardiomyopathien sind eine heterogene Gruppe von Erkrankungen des Herzmuskels, welche mit mechanischen und/oder elektrophysiologischen Fehlfunktionen einhergehen¹. Sie weisen häufig eine verstärkte ventrikuläre Hypertrophie oder Dilatation auf.

Kardiomyopathien werden in primäre und sekundäre Kardiomyopathien unterteilt. Während die sekundären Kardiomyopathien krankhafte Herzmuskelbeteiligungen im Rahmen von systemischen Erkrankungen sind, beschränken sich primäre Kardiomyopathien überwiegend auf den Herzmuskel selbst. Dabei werden sie wiederum in die drei Bereiche *genetisch*, *erworben* und *gemischten Ursprungs* unterschieden. Zu den erworbenen Kardiomyopathien zählt man Erkrankungen, die im Rahmen von Herzmuskelentzündungen (infektiös, nichtinfektiös) auftreten können. Des Weiteren können erworbene Kardiomyopathien bei Stress (z.B. Tako-Tsubo Kardiomyopathie) und während einer Schwangerschaft (Peripartum- bzw. Postpartum-Kardiomyopathie) auftreten.

Arrhythmogene rechtsventrikuläre Kardiomyopathie

Die arrhythmogene rechtsventrikuläre Kardiomyopathie (ARVC) ist eine komplexe Herzmuskelerkrankung, deren klinisches Hauptmerkmal eine Neigung zu ventrikulären Herzrhythmusstörungen ist. Pathoanatomisch kommt es bei der Erkrankung aus bisher unbekanntem Gründen zu einem fettigen oder fibrös-fettigen Ersatz des rechtsventrikulären Myokards. Die Prävalenz wird auf 1:5000 geschätzt. In bis zu 80% aller Fälle wird bei der ARVC eine genetische Komponente vermutet²⁻⁴. Am häufigsten liegt bei den genetischen Formen eine autosomal-dominante Vererbung vor. Es wurden aber auch rezessive Erbgänge identifiziert. Kopplungsstudien konnten bisher sieben genomische Loci für autosomal-dominante ARVC sowie einen Locus für autosomal-rezessive ARVC (auf Chromosom 17q21) nachweisen⁵. Für die autosomal-dominanten Formen konnten als Krankheitsgene auf Chromosom 1q42-q43 der kardiale Ryanodinrezeptor (RYR2) und Desmoplakin (DSP) auf Chromosom 6p24 identifiziert werden. Für die autosomal-rezessiv vererbte Krankheitsform (Naxos Krankheit) wurde eine Mutation im Plakoglobin-Gen (JUP) identifiziert⁶. JUP und DSP sind Zelladhäsionsproteine, welche eine tragende Rolle bei der Formierung von Desmosomen spielen. Die Naxos-Erkrankung, welche nicht nur zu einer ARVC, sondern auch zu einer palmo-plantaren Hyperkeratose sowie zu krausem Haar führt, wurde bisher nur auf

der gleichnamigen griechischen Insel beobachtet. Veränderungen in den Genen für RYR2, JUP und DSP sind eher selten und kommen sowohl syndromal, als auch nicht-syndromal vor.

Dilatative Kardiomyopathie

Zu den gemischten Kardiomyopathien gehört neben der eher seltenen restriktiven Kardiomyopathie die relativ häufig vorkommende dilatative Kardiomyopathie (DCM) mit einer geschätzten Prävalenz von 1:2500. Die DCM ist die dritthäufigste Ursache einer Herzinsuffizienz und der häufigste Grund für eine Herztransplantation. Die Ätiologie der DCM ist sehr verschieden und umfasst neben infektiösen (z.B. Coxsackievirus-, Adenovirus-, HIV-Infektionen und bakteriellen Entzündungen) auch nichtinfektiöse (z.B. alkoholtoxische, arzneimitteltoxische) Ursachen. Die DCM wird in die Gruppe der gemischten Kardiomyopathien eingeordnet, da zusätzlich zu erworbenen Krankheitsursachen zu einem hohen Prozentsatz genetische Faktoren (20-35%) eine Rolle spielen. Bisher konnten mehr als 20 Krankheitsgene und 5 chromosomale Loci im Zusammenhang mit der DCM identifiziert werden⁷.

Zielstellung

Ziel dieser Arbeit war es, neue Krankheitsgene für die ARVC und die DCM zu identifizieren und weiter zu charakterisieren.

Arrhythmogene rechtsventrikuläre Kardiomyopathie

Zur Identifizierung neuer Krankheitsgene für die ARVC führten wir Kandidatengen-Analysen durch. Die bis dahin bekannten Krankheitsgene für ARVC, Desmoplakin und Plakoglobin, kodieren für Proteine, die am Aufbau und an der Funktion von Zell-Zellverbindungen im Herzen beteiligt sind. Ähnlichkeiten in den Knockout-Mausmodellen von Plakoglobin (JUP) und Plakophilin-2 (PKP2) bewogen uns zu der Annahme, dass auch andere Bestandteile des Desmosoms an der Genese der ARVC beteiligt sein könnten. Sowohl die desmosomalen Cadherine Desmocollin-2 (DSC2) und Desmoglein-2 (DSG2) als auch das Armadillo-Protein Plakophilin-2 (PKP2) werden kardial stark exprimiert und sind wichtige Bestandteile des Desmosoms. Diese Gene sollten mittels Direktsequenzierung auf Nukleotidveränderungen untersucht werden.

Dilatative Kardiomyopathie

Wir konnten zwei große Familien mit autosomal-dominant vererbter DCM identifizieren. Zunächst sollten alle betroffenen und nichtbetroffenen Familienmitglieder nach Standard-Kriterien klinisch charakterisiert werden. Da mit Hilfe von genetischen Studien bisher mehrere Krankheits-Loci für die DCM aufzeigt werden konnten, planten wir, durch detaillierte genomweite Kopplungsanalysen den DCM-Locus dieser beiden Familien zu bestimmen. Anschließend sollte das Krankheitsintervall mittels Feinkartierung eingengt werden.

Material und Methoden

Arrhythmogene rechtsventrikuläre Kardiomyopathie

Klinische Evaluation

Die klinischen und genetischen Studien wurden gemäß Institutionsrichtlinien und erst nach positivem Votum der Ethikkommission durchgeführt. Alle partizipierenden Patienten wurden über die geplante Studie informiert und gaben dazu ihre Zustimmung. Erst nach erneuter Zustimmung der Ethikkommission und der Patienten wurden während diagnostischer Herzkatheteruntersuchungen rechtsventrikuläre Biopsien entnommen. Anamnesen, 12-Kanal-EKGs, Langzeit-EKGs und kardiale Bildgebung (2D-Echokardiographie, rechtsventrikuläre Angiographie, kardiales MRT) wurden bei jedem Studienpatienten erhoben, interpretiert und gemäß den Task-Force-Kriterien für die ARVC bewertet.

Genetische Analysen

Genomische DNA wurde von venösen Blutproben isoliert, und die PKP2 Exons und benachbarten Intronsequenzen wurden mittels PCR nach Standardprotokollen (Taq Polymerase, QIAGEN, Hilden, Deutschland) amplifiziert. Die Sequenzierung wurde bidirektional mit dem BigDye Terminator DNA Sequenzierungsakit (Applied Biosystems, Version 2.0) gemäß den Herstellerempfehlungen auf einem 3100 Avant Sequenzierer (Applied Biosystems) durchgeführt. Zur Kontrolle wurden 250 gesunde Probanden mit westeuropäischer Abstammung mittels Direktsequenzierung im PKP2-Gen auf Mutationen untersucht.

Western-Blot Analysen

Für die Proteinexpressionsanalysen wurden während Routine-Herzkatheter Untersuchungen Herzbiopsien entnommen und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Gewebeprobe wurden nach Standardprotokollen lysiert und zusammen mit Kontrollgewebeprobe mittels Western-Blot Analyse analysiert (PKP2⁸, α -Tubulin (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München) Desmocollin 2 (rb36 von Progen).

Quantitative Realtime-PCR

Die kardiale RNA wurde von rechtsventrikulären Herzbiopsien des Mutationsträgers und zwei Kontrollproben mit Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) isoliert. Nach einem DNase I-Verdau wurde die RNA mit Superscript III (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) umgeschrieben. Für die allelspezifische quantitative Realtime-PCR (Eurogentec) wurden folgende Primer verwendet (DSC2 c631-F ATAATTGCCTTTGCAACAACCTCCAG; DSC2 cMut-F CAGTATGAATCTTTTGAGATG GG; DSC2 c800-R: GCA CAC ACT TGT CCC ACA GTA GTG). Die mRNA-Expressiondaten wurden zum β 2-Microglobulin- und 28S-RNA-Gehalt normalisiert.

Zebrafisch-Experimente

Alle Zebrafisch-Experimente wurden mit Wildtyp-Zebrafischen (Tübingen AB) durchgeführt und nach Standardprotokollen gehalten und vermehrt. Das Entwicklungsstadium der Zebrafische wurde nach morphologischen Kriterien und nach der Post-Fertilisationszeit (hpf) bestimmt. Morpholinos (MO) (Gene Tools, Philomath, USA) wurden gegen die Translationsinitiationssequenz und die Spleiß-Akzeptorstellen von Exon 6 und 11 entworfen und mit einer Kontrolle in sterilem Wasser zu einer Konzentration von 1mM resuspendiert und mit 1x Danieau's (58 mM NaCl, 0.7 mM KCl, 0.4 mM MgSO₄, 0.6 mM Ca(NO₃)₂, 0.6 mM HEPES, pH 6.7) auf 100-500 μ M verdünnt. Die MO-Injektionen wurden im Einzellstadium in einem Volumen von ~5 nl durchgeführt. Die Effektivität der MO auf die mRNA-Expression wurde durch quantitative Realtime-PCRs von gepoolten Zebrafisch-Embryos bestimmt. Für die ultrastrukturellen Untersuchungen wurden die Embryonen in 2% Glutaraldehyd in 0.1 M Natrium Cacodylate Puffer (pH 7.4) fixiert und nach Standardprotokollen eingebettet. Ultradünne Schnitte (100 nm) wurden auf einem Reichert-Jung Mikrotom angefertigt und mit 3% Uranylcitrate gefärbt. Die Proben wurden auf einem Philips CM10 Transmissionen-Elektronenmikroskop analysiert. Die Herzfrequenz der Zebrafisch-Embryos (48 hpf) wurde manuell unter einem Dissektionsmikroskop bei 21°C bestimmt. Die Ventrikelgröße und die kontraktile Herzfunktion wurde nicht-invasiv durch eine hochauflösende Video-Mikroskopie analysiert. Als Grundlage für die mRNA-Injektion und die Rettungsversuch-Experimente diente der humane cDNA-DSC2a-Klon (Klon-ID 30337780). Die mutierte humane DSC2-Sequenz wurde in den pCR-Blunt Vektor (Invitrogen) kloniert. Zur Generierung der mRNAs wurden die humanen Wildtyp- und mutierten DSC2a Konstrukte linearisiert und die mRNA in vitro mit dem T7 Message-Machine-Kit (Ambion) umgeschrieben. Für die Rettungsversuch-Experimente wurden

Verdünnungen (10, 50 und 100 ng/μl) von der Wildtyp- und der mutierten humanen DSC2a mRNA zusammen mit den DSC2-MO im Einzellstadium in den Zebrafisch koinjiziert.

Dilatative Kardiomyopathie

Klinische Evaluation

Die klinischen und genetischen Studien für die DCM-Familien wurden gemäß der Institutionsrichtlinien (Massachusetts General Hospital (Familie DCM-50) und der Charité (Familie DCM-100)) und erst nach positivem Votum der Ethikkommission durchgeführt. Alle partizipierenden Patienten wurden über die geplante Studie informiert und gaben dazu ihre Zustimmung. Alle Familienmitglieder wurden klinisch untersucht und detaillierte Anamnesen, 12-Kanal-EKGs, Langzeit-EKGs und bildgebende Verfahren zur Herzdarstellung (2D-Echokardiographie, rechtsventrikuläre Angiographie, kardiales MRT) erhoben, interpretiert und gemäß Standard-Kriterien bewertet. Eine koronare Herzerkrankung wurde durch selektive Herzkatheteruntersuchungen ausgeschlossen. Eine dilatative Kardiomyopathie wurde diagnostiziert, wenn der linksventrikuläre enddiastolische Durchmesser mehr als 117% des korrigierten Normwertes betrug und es gleichzeitig Hinweise auf eine eingeschränkte linksventrikuläre Funktion gab (EF<50%, FS<28%)⁹.

Genetische Analysen

Die genomweiten Kopplungsanalysen wurden mit Mikrosatellitenmarkern durchgeführt, die eine Auflösung von 10 centiMorgan aufweisen¹⁰. Zur Feinkartierung wurden zusätzlich neue Marker in der Zielregion (DNA- Contig AC027672.12.1.187229) generiert. Alle Genotypen wurden ohne Kenntnis des klinischen Befundes erhoben. Zweipunkt- und Multipunkt-LOD-Werte wurden mit einer angenommenen Krankheitspenetranz von 90% errechnet. Um das Krankheitsintervall weiter einzugrenzen, wurden Multipunkt-LOD-Werte mit den Markern D10S521, D10S1760, D10S597, D10S1773, D10S1237, D10S1693, AC027672, D10S1483, D10S1723, D10S1656, D10S217 berechnet (SIMWALK2-Programm). Die Entfernungen der Loci und der Reihenfolge der Marker basieren auf der Génethon-Karte¹¹. Kandidatengene innerhalb des Krankheitsintervalls wurden mittels Direktsequenzierung auf Mutationen untersucht. Zur Bestimmung der Kopplung wurde der LOD-Wert (logarithm of the odds, auch z-Wert) als Kriterium herangezogen. Der LOD-Wert wurde in Varianten der Rekombinationshäufigkeit (Theta-Wert) zwischen den Loci berechnet. Eine paarweise Analyse der LOD-Werte erfolgte unter Verwendung des MLINK-Programms nach folgender mathematischer Berechnung: $\text{LOD-Wert} = z(\text{Theta}) = \log$.

Ergebnisse

Arrhythmogene rechtsventrikuläre Kardiomyopathie

Plakophilin 2:

120 westeuropäische Patienten (101 Männer, 19 Frauen) konnten in die Studie eingeschlossen werden und wurden gemäß der Task Force Kriterien für ARVC diagnostiziert. Wir sequenzierten alle 14 PKP2-Exone (einschließlich der flankierenden Intron-Sequenzen) und identifizierten 25 verschiedene Mutationen in 32 ARVC-Patienten (27 Männer, 5 Frauen). Von den 25 PKP2-Mutationen waren 12 Insertionen/Deletionen, 6 Nicht-Sinn-Mutationen, 4 Fehl-Sinn-Mutationen und 3 Spleißstellen-Mutationen (Abb. 1).

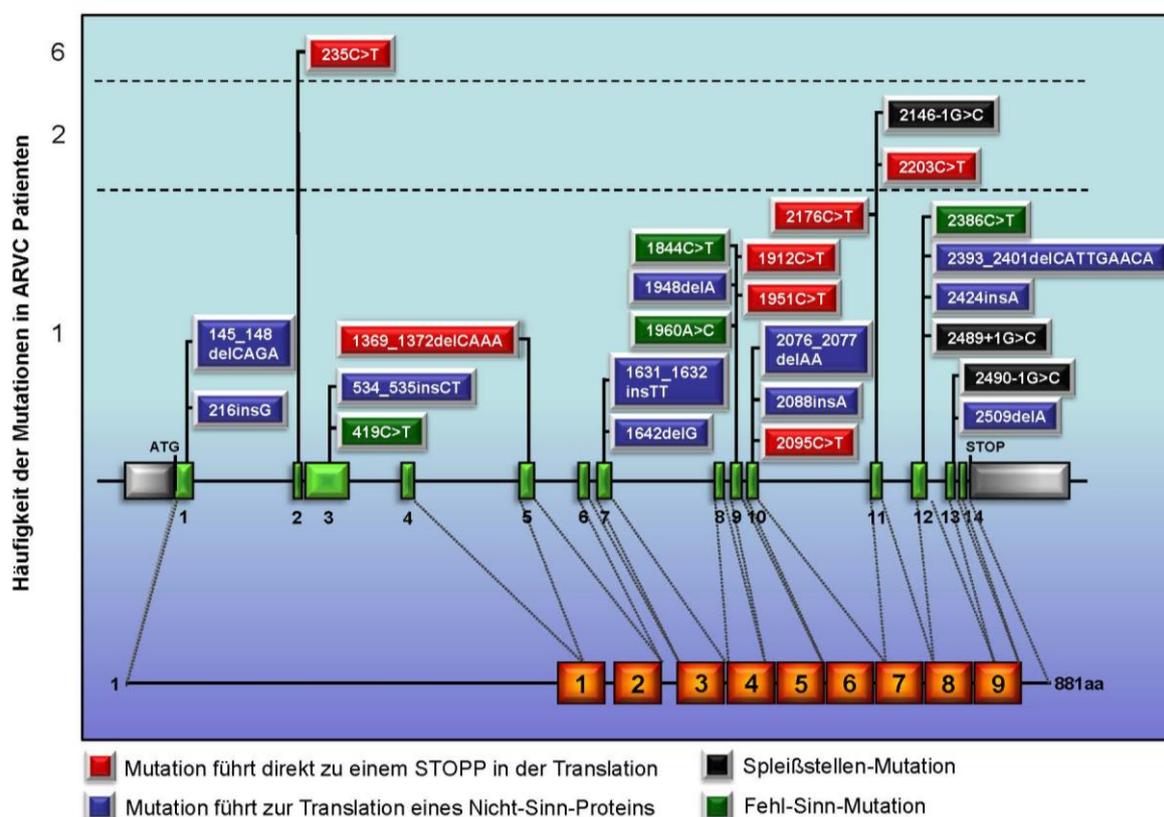


Abb 1: Genomische Struktur und die Protein-Struktur von Plakophilin 2 mit ARVC assoziierten Mutationen. Das humane Gen für Plakophilin 2 hat 14 Exone, die Nummerierung der Nukleotide beginnt beim ATG und bezieht sich auf die Genbank-Zugriffsnummer X97675. Graue Linien begrenzen die Bereiche des Proteins, die von entsprechenden Exons kodiert werden. Die Ziffern kennzeichnen dabei die neun Armadillo-Motive von PKP2. Die Positionen der 25 gefundenen Mutationen in ARVC-Patienten sind anhand der genomischen Sequenz dargestellt. Mutationen, die zu einem Stopp-Kodon führen sind rot, Leserasterverschiebungen grün, Spleißstellenmutationen dunkelblau und Fehlsinn-Mutationen blau unterlegt. Die Häufigkeit der einzelnen Mutationen ist durch die Y-Achse gekennzeichnet. aa, Aminosäuren.

Obwohl die Mehrzahl der Mutationen in der carboxyterminalen Hälfte des Moleküls gefunden wurde, sind die Mutationen über das gesamte Gen verteilt. Eine PKP2- Spleißstellen-Mutation

(2146-1G>C) und zwei Fehl-Sinn-Mutationen (235C>T; 2203C>T) wurden in mehreren nicht verwandten ARVC-Patienten gefunden. Keine der 25 verschiedenen PKP2-Mutationen konnte in >500 Kontrollchromosomen nachgewiesen werden. Für eine detaillierte klinische und genetische Analyse standen uns zwei Familien (A100 und EPF) mit autosomal-dominant vererbter ARVC zu Verfügung. Eine 2bp Deletion (2076_2077delAA; Abb. 2A) im Exon 10 von PKP2 konnte bei sechs Familienmitgliedern der Familie A100 identifiziert werden. Diese Deletion würde auf Proteinebene theoretisch zur Bildung von 48 neuen Aminosäuren und zur Insertion eines verfrühten Stopp-Kodons (C693fsX741) führen. Die durchgeführte Western-Blot-Analyse einer rechtsventrikulären Myokardbiopsie konnte jedoch kein trunkiertes Protein (erwartete Größe des trunkierten PKP2: 82,1kDa; normal PKP2: 97,4kDa) nachweisen. Jedoch wies die Analyse der Herzbiopsie deutlich reduzierte PKP2-Wildtypproteinmengen im Vergleich zu Kontrollgewebe auf (Abb. 2B).

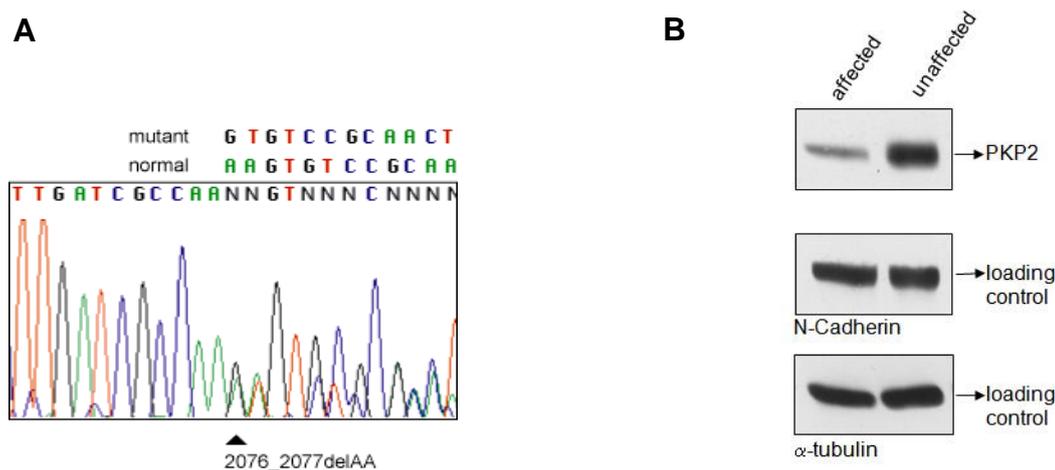


Abb 2: Sequenzierung (A) und Western-Blot einer Herzbiopsie (B) eines ARVC-Patienten mit der Mutation 2076_2077delAA. Die Western-Blot-Analyse stammt von einer Herzbiopsie des rechten Ventrikels eines ARVC-Patienten mit einer Leserasterverschiebungs-Mutation, die zu einem vorzeitigen STOPP-Kodon nach 741 Aminosäuren führt. Mit verschiedenen Antikörpern gegen Plakophilin 2 konnte kein verkürztes Protein von 83 kDa detektiert werden (ein anti-Head-Antikörper richtet sich gegen die Aminosäuren 131-148 und sollte somit ein verkürztes Protein erkennen). Das Ergebnis zeigt jedoch eine reduzierte Menge des Wildtyp-PKP2-Proteins im Vergleich zum Kontrolllysate einer rechten Herzbiopsie eines Patienten ohne ARVC und ohne Plakophilin 2-Mutation. N-Cadherin und α -Tubulin dienen als Ladekontrollen.

Die klinische Evaluation der Verwandten ersten Grades der Familie A100 identifizierte zwei Individuen, die die Task Force Kriterien für ARVC erfüllen. Die vier anderen Mutationsträger der Familie zeigen jedoch nur milde, bzw. keine ARVC-Symptome. Zwei Mitglieder einer zweiten ARVC-Familie (EPF) verstarben unerwartet im Alter von 15 und 16 Jahren. In beiden Fällen konnte durch eine Autopsie eine ARVC nachgewiesen werden. Von fünf anderen Mutationsträgern in der EPF-Familie zeigt nur einer typische Zeichen einer ARVC.

Die Grundlage dieser inkompletten Penetranz in den beiden Familien A100 und EPF ist bisher unbekannt. Sie könnten aber mit dem Geschlecht, mit genetischen oder epigenetischen Unterschieden oder noch anderen unbekanntem Faktoren (z.B. einer viralen Infektion als Auslöser für die Erkrankung) verbunden sein.

Desmocollin 2:

88 miteinander nicht verwandte Westeuropäer mit einer gesicherten ARVC-Diagnose und einem Ausschluss einer PKP2-Mutation wurden systematisch mittels Direktsequenzierung auf Mutationen in den Genen von DSC2 und DSG2 untersucht. Bei einem 58 Jahre alten männlichem Patienten konnten wir eine A→G Transition in der hoch konservierten 3'Spleiß-Akzeptor-Stelle des Intron 5 im DSC2-Gen identifizieren (Abb. 4A). Diesen Basenaustausch konnten wir in 500 westeuropäischen Kontrollchromosomen nicht nachweisen. Wir fanden keine weiteren Mutationen in den beiden Genen DSC2 und DSG2. Die klinische Charakterisierung des Patienten mit der Mutation c.631-2A→G zeigte einen EKG-Befund mit negativen T-Wellen in den Ableitungen (V1-V6), eine ARVC typische Epsilon-Welle in V1 und echokardiographische Anzeichen eines deutlich dilatierten, hypokinetischen rechten Ventrikels mit Trabekularisierungsstörungen (Abb. 3A-D). Die linksventrikuläre Funktion und Größe lagen im Normbereich. Ventrikuläre Arrhythmien mit Linkschenkelblock traten im Alter von 43 Jahren bei dem Patienten auf und führten zur Implantation eines kardialen Defibrillators (ICD) und zum Beginn einer medikamentösen antiarrhythmischen Therapie. Keiner der Angehörigen des Patienten zeigte ARVC typische Symptome.

Um die c.631-2A→G Mutation näher zu untersuchen, führten wir RT-PCRs von DSC2 mRNA sowohl von Lymphozyten als auch von Herzbiopsien des Patienten durch. Zusätzlich zu dem normalen Transkript konnten wir ein deutlich verkürztes DSC2-Transkript nachweisen. Die RT-PCR-Produkte wurden kloniert, und die Sequenzanalyse zeigte ein falsch gespleißtes Transkript. Die Mutation führt zur Aktivierung einer neuen „kryptischen Spleiß-Akzeptor-Stelle“ in Exon 6 und zu einer Deletion von 25 Nukleotiden. Auf Proteinebene führt diese Deletion theoretischerweise zu einer Leserasterverschiebung, zur Bildung von zehn neuen Aminosäuren und zur Insertion eines verfrühten Stopp-Kodons. Somit würde dem vorhergesagten trunkierten Protein die hochkonservierte CAR-Sequenz von DSC2 fehlen.

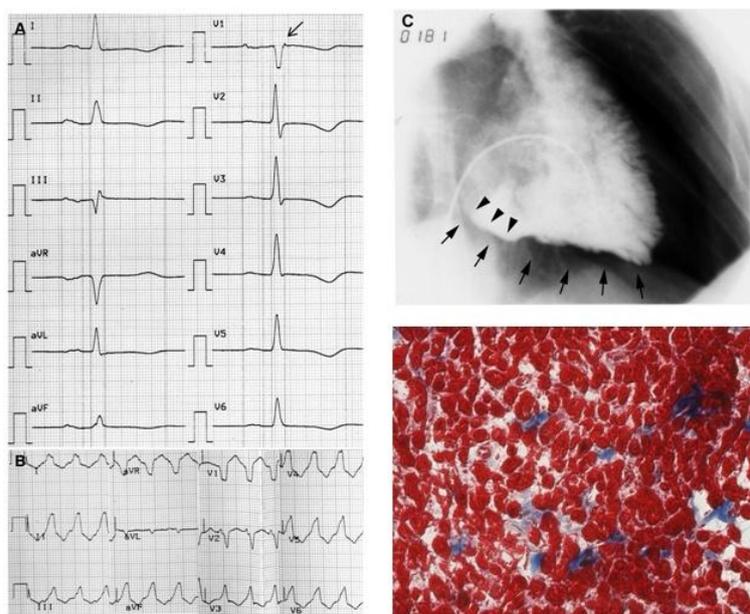


Abb 3: Klinische Befunde des Mutationsträgers. A, das 12-Kanal Ruhe-EKG (50 mm/s) zeigt negative T-Wellen in den Ableitungen (V1-V6) und eine Epsilon-Welle in V1 (Pfeil). B, Das EKG (25 mm/s) zeigt eine ventrikuläre Tachykardie mit Linksschenkelblockmorphologie. C, Die Aufnahme eines rechtsventrikulären Angiogramms zeigt einen vergrößerten rechten Ventrikel mit diastolischem „Bulging“ in Höhe des Einflusstrakts und einer diffusen inferioren Hypokinesie (Pfeile). D, Histologie (Masson-Trichrom-Färbung) der Herzbiopsie.

Um die Mengenverhältnisse zwischen Wildtyp-mRNA und des mutierten Transkripts zu analysieren, führten wir eine allelspezifische Realtime-PCR durch. Wir fanden eine signifikante Reduktion des mutierten DSC2 Transkripts (3%). Im Vergleich mit Kontrollherzgewebe konnten wir zusätzlich eine deutliche Reduktion der Wildtyp DSC2 mRNA-Menge (60%) in der kardialen Biopsie des Patienten nachweisen (Abb. 4C). In Western-Blot-Analysen beobachteten wir ebenfalls deutlich reduzierte DSC2-Wildtyp-Proteinmengen im Vergleich mit Kontrollgewebe (Abb. 4B).

Um die Rolle des mutierten DSC2 in der Herzstruktur und Herzfunktion in vivo besser zu verstehen, rekapitulierten wir die Spleiß-Stellen-Mutation im Zebrafisch. Wir klonierten das DSC2 Zebrafischortholog (*dsc2*), welches auf Proteinebene ungefähr 35% homolog zur murinen und humanen Sequenz ist. Das *dsc2* Gen kodiert für ein 892 Aminosäuren langes Protein, das alle wichtige Desmocollin-Domänen enthält. Das Expressionsmuster untersuchten wir mittels in situ Hybridisierung an ganzen Zebrafischembryonen verschiedener Entwicklungsstadien. Am stärksten war *dsc2* im Herzen nach 48 hpf exprimiert. Für die Knockdown-Experimente verwendeten wir Antisense-Morpholinos gegen die Erkennungssequenz des Translationsstarts und gegen die Spleiß-Akzeptor-Stellen der Exone 6 und 11 des Zebrafischortholog *dsc2*. Alle drei Morpholinos verursachen im Zebrafisch eine

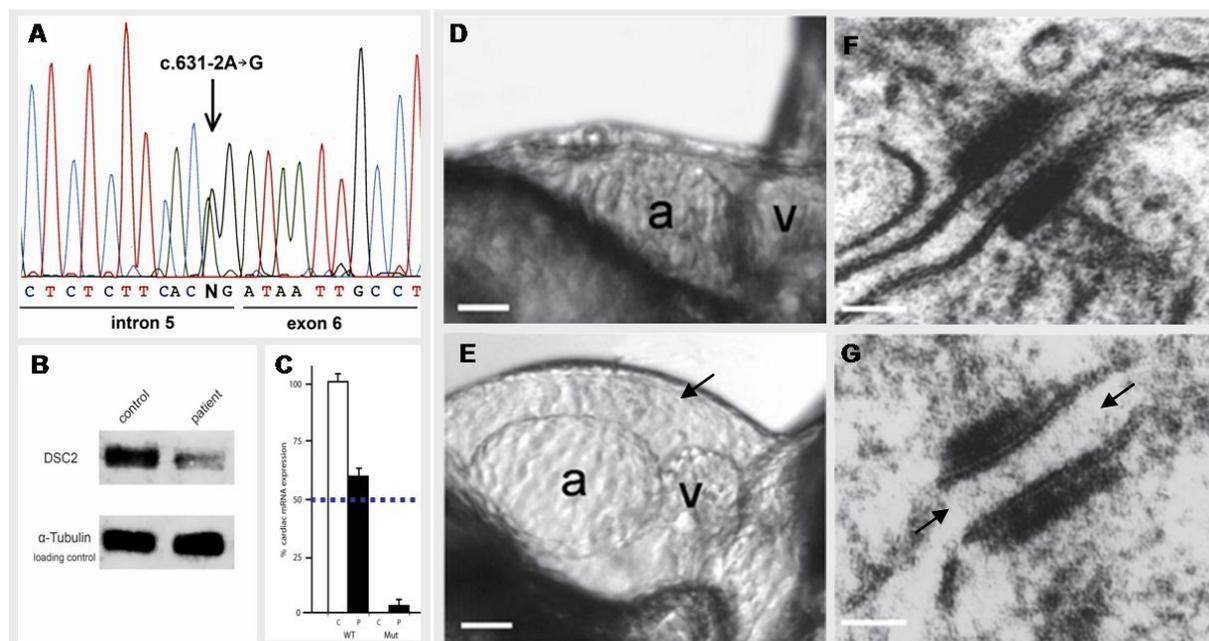


Abb 4: (A) Partielle Nukleotidsequenz vom DSC2 Intron 5 -Exon 6 Übergang. Die genomische Sequenz des betroffenen Patienten zeigt eine heterozygote A → G Transition der Spleiß-Akzeptorstelle von Intron 5. (B) Die Western-Blot-Analyse der rechtsventrikulären Myokardbiopsie des Patienten mit der DSC2 Mutation c.631-2A→G. Die DSC2-Wildtypproteinmenge ist im Vergleich mit der Kontrolle deutlich reduziert. (C) Allelspezifische quantitative Realtime PCR von der DSC2 Wildtyp (WT) und mutierten (MUT) mRNA von Herzgewebe des Patienten (P) und Kontrollproben (C). Die Expression des mutierten Allels des Patienten ist im Herzgewebe deutlich reduziert. Hochauflösende Aufnahmen des Herzens von Wildtyp- (D) und *dsc2*-Knockdown- (E) Zebrafischembryos zeigen deutliche perikardiale Ödeme (Pfeil). Elektronenmikroskopische Aufnahmen der kardialen Desmosomen von Wildtyp- (F) und *dsc2*-Knockdown- (G) Zebrafischembryos. Den *dsc2*-Knockdown-Zebrafischen fehlt in über 90% der Desmosomen die elektronendichte Mittellinie. a: Vorhof; v: Ventrikel; Balken = 25 μ M (D,E); 50 nm (F,G)

deutliche Reduktion der *dsc2* mRNA-Expression. Die Knockdown-Zebrafischembryos zeigten dosisabhängig einen deutlich pathologischen kardialen Phänotyp, mit signifikanten Bradykardien, Kammerdilatationen und kardialen Dysfunktionen. Dabei entwickelten die Embryonen 48 hpf progressive perikardiale Ödeme (Abb. 4E). Bei Embryonen, denen wir verschiedene Konzentrationen von Kontrollmorpholinos injizierten, konnten wir keinen pathologischen Phänotyp beobachten. Die mittlere Herzfrequenz der Kontrollfische betrug $136,7 \pm 8,3$ Schläge/min (n=12) bei 22°C im Vergleich zu $114,4 \pm 9$ Schlägen/min (n=12) in den KD-Zebrafischen. Die ventrikuläre Verkürzungsfraktion war deutlich von $0,66 \pm 0,09$ in Kontrollen auf $0,41 \pm 0,07$ in den KD-Fischen reduziert. Mit elektronenmikroskopischen Aufnahmen von kardialen Desmosomen konnten wir zeigen, dass sich im Gegensatz zu Kontrollfischen in KD-Zebrafischembryos (48 hpf) keine normale extrazelluläre elektronendichte desmosomale Mittellinie ausbildet (Abb. 4G). Wir waren in der Lage, diesen pathologischen Phänotyp durch Koinjektion von humaner DSC2-wildtyp-mRNA wieder aufzuheben, nicht jedoch mit der mutierten DSC2-mRNA.

Dilatative Kardiomyopathie

In der Familie DCM-50 (Abb. 5) waren 15 Personen an DCM erkrankt und 4 zeigten einen indifferenten Phänotyp. Die übrigen 17 Familienmitglieder wurden als nicht betroffen klassifiziert. Person I-1 verstarb im Alter von 29 Jahren, und 14 von seinen Nachkommen leiden unter einer idiopathischen Herzerkrankung. Davon verstarben fünf völlig unerwartet ohne vorhergehende Krankheitssymptome (II-2, II-12, III-15, III-24, und III-25). Zwei Nachkommen entwickelten eine signifikante Herzinsuffizienz und verstarben nach einer Herztransplantation (III-4 und III-13). Keine der betroffenen Personen litt unter Störungen der Skelettmuskeln bzw. des Reizleitungssystems. Bei der Familie CM-50 manifestierte sich die DCM im Mittel mit 34 Jahren. Bei den erkrankten Familienmitgliedern konnten wir eine deutliche linksventrikuläre Dilatation und eine deutlich eingeschränkte linksventrikuläre Funktion nachweisen. Die Autopsien der Verstorbenen zeigen durchgängig makro- und mikroskopische Zeichen von interstitieller Myokardfibrose.

In der Familie DCM-100 (Abb. 5) wurden 16 Personen mit einer DCM diagnostiziert, sechs zeigten einen indifferenten Phänotyp (II-1, III-2, IV-4, IV-13, V-2, und V-6), und die übrigen acht Familienmitglieder wurden als nicht betroffen klassifiziert. Patient I-1 verstarb im Alter von 43 Jahren an Herzinsuffizienz. 15 seiner Nachkommen haben ebenfalls eine DCM. Neun der erkrankten Personen verstarben vorzeitig an Herzinsuffizienz. Der Index-Patient (V-4) entwickelte eine progressive Herzinsuffizienz und musste im Alter von 12 Jahren transplantiert werden. Die Histologie des explantierten Herzens zeigte eine diffuse interstitielle Fibrose. Bei der Familie DCM-100 manifestierte sich die DCM im Mittel mit 32 Jahren. Bei den meisten der betroffenen Personen der Familie konnten wir echokardiographisch eine ausgeprägte segmentale linksventrikuläre Hypokinesie diagnostizieren.

Wir erhoben unabhängige Zweipunkt-LOD-Werte von 3,39 ($\theta = 0,0$) mit Marker D10S1773 für Familie CM-50 und 3,16 ($\theta = 0,0$) mit Marker D10S1483 für Familie CM-100. Diese LOD-Werte waren auch nach Veränderungen der angenommenen Penetranz (0,95-0,60) oder der angenommen Allelfrequenz höchst konsistent. Haplotypenanalysen zeigen eine deutliche Überlappung der Loci beider Familien. Aus der Kombination der Haplotyp-Daten beider Familien errechnet sich ein kritisches genetisches Intervall von 14 centiMorgan zwischen den Markern D10S1237 und D10S1723. Dieses entspricht einer physikalischen Entfernung von 9,5 Megabasen.

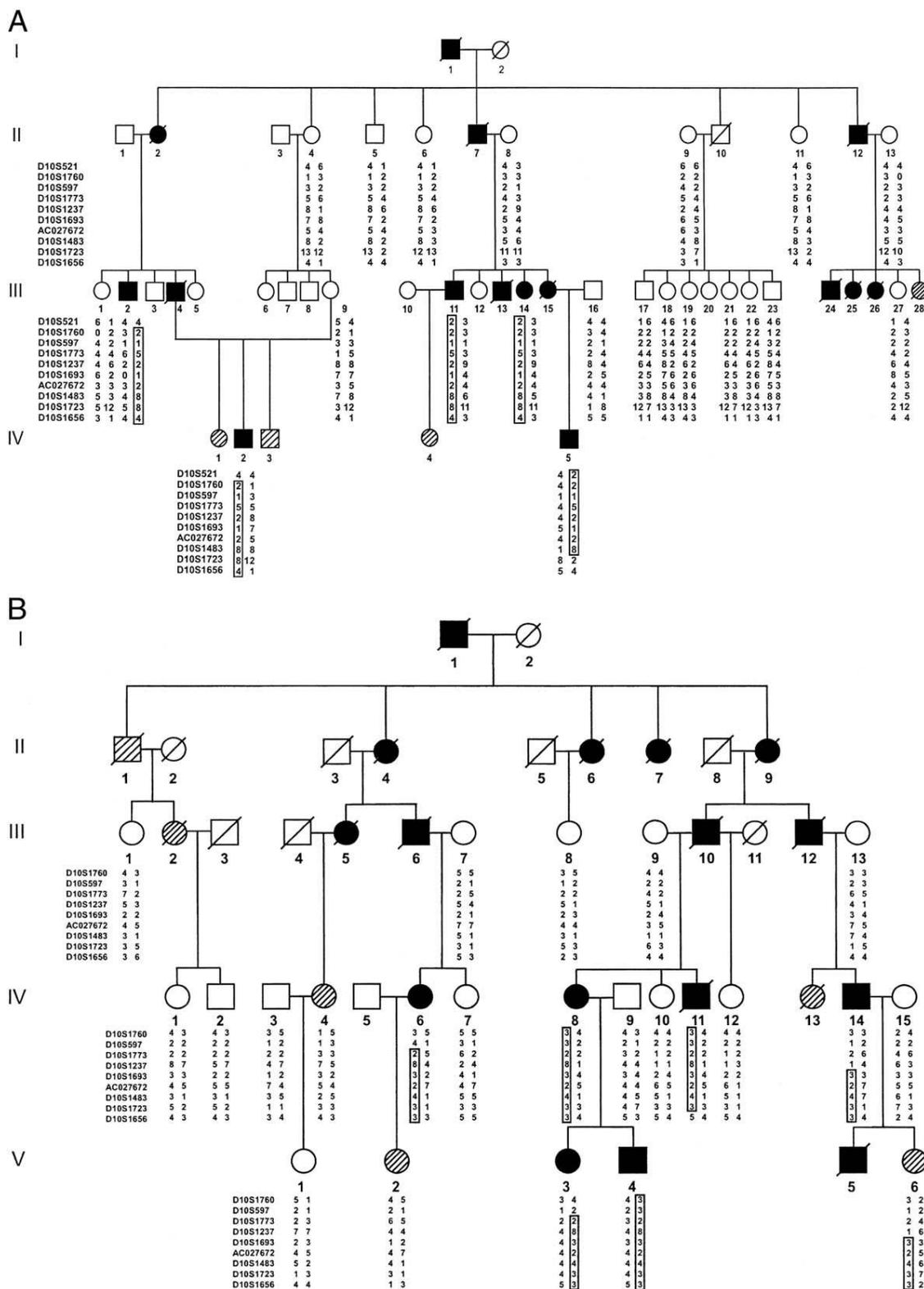


Abb 5: Stammbäume und Haplotypen der Familien DCM-50 (A) und DCM-100 (B). Schwarze Symbole kennzeichnen die an DCM erkrankten Personen; weiße Symbole, unbetroffene Personen; und schraffierte Symbole, unbekannte bzw. intermediärer klinischer Status. Die Kreise repräsentieren die weiblichen, Quadrate die männlichen Familienmitglieder. Die Reihenfolge der Mikrosatellitenmarker wurde vom Zentromer zum Telomer angegeben.

Das Rekombinationsereignis eines Betroffenen der Familie DCM-50 IV-5 definiert D10S1723 als den distal flankierenden Marker. Der proximal flankierende Marker D10S1237 wird durch das Rekombinationsereignis eines Betroffenen der Familie DCM-100, IV-14, definiert. Die Multipunkt-Kopplungsanalyse bestätigt das Krankheitsintervall und generiert einen LOD-Wert von 8,2 für den Marker AC027672 (Abb. 6).

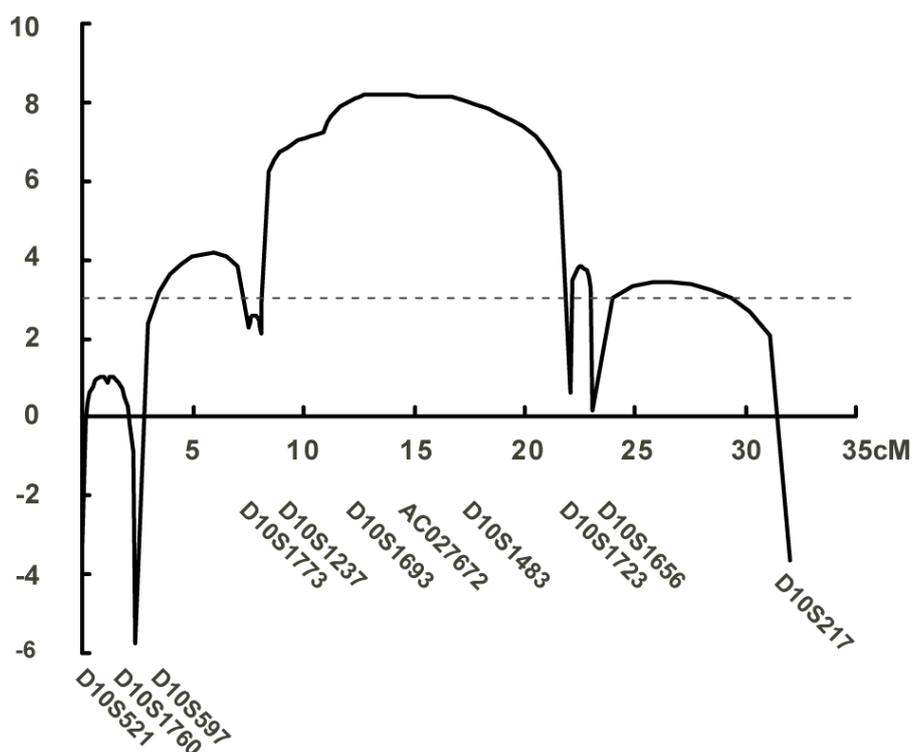


Abb 6: Multipunkt LOD-Wertkurve. Der Multipunkt LOD-Wert ist auf der Abszisse eingetragen. Die Distanz der Rekombination ist auf der Ordinate in centiMorgan (cM) vom arbiträren Ursprung des Markers D10S521 gekennzeichnet.

Diskussion

Arrhythmogene rechtsventrikuläre Kardiomyopathie

Plakophilin-2

Plakophilin-2 (PKP2) gehört zur Familie der Armadillo-Proteine. Diese Armadillo-Proteine sind beteiligt an der Bildung von Zelladhäsionsstrukturen wie Adhärenz-Verbindungen und Desmosomen. Sie haben daher eine wichtige Funktion in der Stabilität und Integrität von Geweben. Beide Zellverbindungen stärken den Zusammenhalt epithelialer, aber auch nicht-epithelialer Gewebe (z.B. Herzmuskel), dabei verankern Desmosomen das intermediäre Zytoskelett und die Adhärenz-Verbindungen das Aktinzytoskelett. Da Desmosomen vor allem in Geweben vorhanden sind, die mechanischem Stress ausgesetzt sind (Herz, Haut, Hirnhäute), wird ihnen eine primär strukturelle Funktion zugetragen. Die Zelladhäsionskomplexe gewährleisten die mechanische Integrität der Zellen und Organarchitektur. Sie sind aber nicht nur an der bloßen Kraftübertragung zwischen Zellen beteiligt, sondern nehmen auch an wichtigen Prozessen der zellulären Signaltransduktion teil¹². Die hier beschriebenen Hinweise der kritischen Rolle der Plakophiline für den Desmosomenaufbau und dessen Funktion werden von zwei zuvor publizierten Studien unterstützt: 1. Die Identifizierung von rezessiven Mutationen im Plakophilin-1, welche das ektodermale Hautfragilitätssyndrom (MIM 604536) verursachen¹³. Bei dieser seltenen Hauterkrankung findet man charakteristischerweise kleine und dysplastisch geformte Desmosomen. Zusätzlich sind die Interaktionen zwischen den Desmosomen und den Intermediärfilamenten gestört. 2. Knockout-Experimente in der Maus zeigen die Wichtigkeit von PKP2 für die embryonale Herzmorphogenese und Bildung von normalen Zell-Zell-Kontakten¹⁴. Die KO-Embryonen verstarben intrauterin um den Entwicklungstag 10.75 und zeigten deutliche Veränderungen in der Herzentwicklung. Dabei führen Defekte der Zelladhäsion in den Glanzstreifen des Herzmuskels zu perikardialen Einblutungen. Elektronenmikroskopische Aufnahmen sowie biochemische Ergebnisse konnten stark reduzierte Assoziationen der Proteine Desmoplakin und Plakoglobin mit den anderen Plaque-Proteinen an den Glanzstreifen demonstrieren. Diese Veränderungen treten zu einem ähnlichen Zeitpunkt auf wie die in früheren Arbeiten beschriebenen Deletionen des Armadillo-Proteins Plakoglobin. Diese Ergebnisse zeigen, dass das sich entwickelnde Herz besonders empfindlich gegenüber Veränderungen der Zelladhäsion in Kardiomyozyten reagiert. Da Plakophilin-2 die einzige Plakophilin-Isoform ist, welche in den Zellverbindungen des Myokards exprimiert wird, ist Plakophilin-2 ein essentielles Protein in

der Organisation der kardialen Zellverbindungen. Plakophilin-1 und Plakophilin-2 spielen eine wichtige Rolle für den Desmosomenaufbau und dessen Funktion in der Haut- und Herzentwicklung.

Wir konnten mit Plakophilin-2 (PKP2) das bisher häufigste Krankheitsgen für ARVC identifizieren. 27% unserer 120 ARVC-Indexpatienten aus Deutschland und den USA zeigten Nukleotidveränderungen im PKP2-Gen. Inzwischen konnten unsere Ergebnisse in weiteren ARVC-Kollektiven aus den USA, Italien, Finnland, den Niederlanden und Großbritannien bestätigt werden¹⁵⁻²⁵. Die Häufigkeit von PKP2-Mutationen liegt in den unterschiedlichen Veröffentlichungen zwischen 10% und 43%. Für eine Genotyp-/Phänotypanalyse standen uns zwei ARVC-Familien zur Verfügung. In beiden Familien konnten wir eine deutlich reduzierte Krankheitspenetranz nachweisen. Diese Beobachtung könnte erklären, weshalb Plakophilin-2 nicht zuvor durch Kopplungsanalysen identifiziert werden konnte.

Desmocollin-2

DSC2 ist zusammen mit anderen desmosomalen Cadherinen, Armadilloproteinen und Plakinen entscheidend am Aufbau von Zelladhäsionskomplexen beteiligt, die die mechanische Stabilität der Gewebe durch Verankerung mit den Intermediärfilamenten gewährleisten. Es wird vermutet, dass die Desmocolline und Desmogleine zusätzlich zu ihrer Zelladhäsionsfunktion wichtige zellsensorische Aufgaben erfüllen und die intrazelluläre Signaltransduktion beeinflussen²⁶⁻²⁷. In der späteren Embryonalentwicklung sind desmosomale Proteine in den Organen Herz und Haut von besonderer Bedeutung. Bisher identifizierte Mutationen beim Menschen sowie gentechnisch eingefügte Mutationen in der Maus führen häufig zu Phänotypen, welche die Funktion dieser beiden Organe beeinträchtigen. Deletionen desmosomaler Cadherine in der Maus ähneln den Phänotypen menschlicher Krankheiten und führen zu Läsionen in Schleimhäuten (DSG3) bzw. zu epidermaler Fragilität und Läsionen, einhergehend mit Hyperproliferation und Haarverlust (DSG4, DSC1).

Wir konnten DSC2 als neues Krankheitsgen für die ARVC identifizieren. Allelspezifische quantitative RT-PCRs der Biopsie des Patienten zeigten eine signifikante Reduktion der mutierten RNA, so dass „nonsense mediated decay“ (NMD) und die daraus resultierende Haploinsuffizienz als möglicher genetischer Mechanismus zu vermuten sind. Westerblot-Analysen bestätigten dieses Ergebnis und zeigten eine Reduktion des DSC2-Wildtypproteins. Diese Ergebnisse werden zusätzlich durch unsere Zebrafisch-Experimente bestätigt, in denen der Knockdown von DSC2 zu einer hochgradigen Störung der Desmosomenstruktur und der

kontraktilen Funktion des Myokards führt. Wird die hier beschriebene dominante Mutation (c.631-2A→G) exprimiert und translatiert, führt sie zu einem verkürzten DSC2 Protein, dem die hoch konservierte CAR Sequenz in der ersten extrazellulären Domäne (EC1) fehlt, welche in allen klassischen und desmosomalen Cadherinen vorhanden ist. Bei den klassischen Cadherinen konnte gezeigt werden, dass die CAR-Motive essentielle Bestandteile des extrazellulären Adhäsionsapparates darstellen. Die adenovirale Transfektion von dominant-negativen Mutationen (Deletion von EC1-EC4) verschiedener desmosomaler Cadherine verhindert in Keratinozytenkulturen die Ausbildung von Zell-Zell-Adhäsionskomplexen²⁸⁻³⁰. Das trunkierte Protein, welches durch das mutierte Allel entstünde, könnte einen dominant-negativen Effekt auf die Zell-Zell-Adhäsion ausüben. Jedoch weisen die Ergebnisse der quantitativen allelspezifischen Realtime-PCR darauf hin, dass die mutierte DSC2-mRNA schon auf RNA-Ebene degradiert wird, und dass daher die Haploinsuffizienz als genetischer Krankheitsmechanismus angenommen werden kann.

Vor kurzem wurden in einer italienischen Population Mutationen im DSG2-Gen identifiziert³¹. Diese Ergebnisse konnten wir in unserem Patientenkollektiv von 88 ARVC-Index-Patienten nicht bestätigen. Mögliche Gründe für solch ein variables Auftreten von DSG2 Mutationen in ARVC-Kohorten können möglicherweise durch unterschiedliche geografische oder ethnische Ursprünge der untersuchten Populationen und durch abweichende ARVC-Selektionskriterien erklärt werden.

Die Untersuchungen großer ARVC-Familien mit PKP2-Mutationen zeigten Krankheitspenetranzen zwischen 30-50%. Die hohe Varianz bei gleichzeitig reduzierter Penetranz der ARVC deutet darauf hin, dass es noch weitere, bisher unbekannte genetische bzw. epigenetischen Einflüsse gibt. Bis zum heutigen Zeitpunkt versteht man die molekularen Mechanismen der ARVC nur unvollständig. Die Identifizierung der neuen Krankheitsgene PKP2, DSC2 und DSG2 in den Jahren 2004 bis 2006 stärkt die Hypothese, dass die ARVC überwiegend als eine desmosomale Erkrankung anzusehen ist. Unsere Daten zeigen, dass desmosomale Mutationen dazu führen können, dass weniger PKP2 bzw. DSC2 im Herzmuskel vorhanden ist und somit weniger PKP2 und DSC2 für die Aufrechterhaltung der desmosomalen Funktion zur Verfügung steht. Bei erhöhter Beanspruchung, wie z.B. Sport, könnte die verringerte Desmosomenstabilität zu einem vermehrten Zelluntergang mit nachfolgendem Ersatz der Kardiomyozyten durch Fett- und Bindegewebe führen. Dies könnte die hohe Krankheitsprävalenz der ARVC bei aktiven Sportlern erklären. Jedoch üben desmosomale Proteine nicht ausschließlich strukturelle Funktionen aus, sondern sind in wichtige Prozesse der intrazellulären Signaltransduktion eingebunden. Hinweise auf mögliche

Einflüsse der desmosomalen Komponenten auf die Signaltransduktion konnte kürzlich ein Maus-Modell geben. Garcia-Gras et al.³² konnten bei heterozygoten Desmoplakin-Knockout-Mäusen einen ARVC ähnlichen Phänotyp beobachten. Sie zeigten, dass in diesen Mäusen der kanonische Wnt/ β -Catenin Signalweg supprimiert ist. Es ist bekannt, dass eine Suppression des Wnt/ β -Catenin Signalwegs zu einer Steigerung der Expression von pro-adipogenetischen und pro-fibrotischen Faktoren führen kann. Weitere in vivo und in vitro Studien von PKP2, DSC2 und anderen desmosomalen Molekülen werden neue Einblicke in die molekularen Mechanismen der ARVC geben. Die dadurch erworbenen Erkenntnisse könnten helfen, die ARVC besser zu verstehen und somit eventuell früher zu diagnostizieren und effektiver zu behandeln.

Dilatative Kardiomyopathie

Mit Hilfe der Kopplungsanalysen der zwei Familien konnten wir einen neuen Locus für die DCM auf Chromosom 10 identifizieren, welcher mit charakteristischen klinischen Symptomen wie interstitieller Myokardfibrose und plötzlichem Herztod einhergeht. Die genetischen Ursachen der DCM sind sehr heterogen. Einblicke in diese Heterogenität wird erst die Identifizierung der krankheitsverursachenden Mutationen in den verschiedenen Loci geben. Jedoch weisen die bisher identifizierten Krankheitsgene darauf hin, dass die DCM durch Veränderungen in vielen Proteinen, wie z.B. den Proteinen des Zytoskeletts und des Sarkomers, Transkriptionsfaktoren und Ionen-Kanälen verursacht werden kann (Tabelle 1)³³⁻³⁹. Ein auffälliges klinisches Symptom der Erkrankten in den untersuchten Familien war neben der signifikanten ventrikulären Dilatation eine ausgeprägte interstitielle und subendokardiale Fibrose. Diese Art von Fibrose wird normalerweise eher in pädiatrischen Formen der DCM gefunden. Myokardiale Fibrosen im Zusammenhang mit Kardiomyopathien (DCM, HCM, ARVC) sind häufig mit dem plötzlichen Herztod assoziiert.

Möglicherweise führen die teilweise diffusen Fibrosen zu elektrischen Inhomogenitäten des Myokards^{40,41}, die wiederum das Auftreten von ventrikulären Herzrhythmusstörungen begünstigen. In der von uns beschriebenen Familie (DCM-50) ist der plötzliche Herztod ein Hauptmerkmal. Fünf Personen verstarben ohne vorhergehende Symptome im Alter von 19 bis 54 Jahren. Myokardiale Fibrosen konnten in murinen Kardiomyopathiemodellen mittels Knockout von verschiedenen Genen, wie dem kardialen LIM Protein (CSRFP3), dem Actinin

<i>Chromosomale Lokalisation</i>	<i>Gen</i>	<i>Protein</i>
„Isolierte“ DCM		
1q32	TNNT2	Kardiales Troponin T
2q31	TTN	Titin
2q35	DES	Desmin
5q33	SGCD	δ-Sarcoglycan
6q12-q16	?	?
9q13-q22	?	?
9q22-q31	?	?
10q22-q23	VCL	Metavinculin
14q12	MYH7	β-Myosin heavy chain
15q14	ACTC	Kardiales Aktin
15q22	TPM1	α-Tropomyosin
DCM + Störungen Erregungsbildung und -leitung		
1p1-q21	LMNA	Lamin A und C
2q14-q22	?	?
3p22-p25	?	?
10q25-q26 (neu)	?	?
DCM + Skelettmypathie mit und ohne Erregungsbildungs- und -leitungsstörungen		
1p1-q21	LMNA	Lamin A und C
6q23	?	?
DCM + Sensorineuralem Hörverlust		
6q23-q24	?	?

Tabelle 1: Genloci der autosomal dominanten Form der DCM mit den dazugehörigen Genen und den entsprechenden Proteinen.

assoziierten LIM Protein (PDLIM3) und durch verschiedene Überexpressionsmodelle identifiziert werden^{42,43}. Es bleibt zu klären, ob die Fibrose und der plötzliche Herztod mit spezifischen molekularen Mechanismen in Verbindung gebracht werden können. Der von uns definierte neue Locus erstreckt sich auf ca. 14 cM bzw. 9,5MB und beinhaltet laut aktuellen Gen-Datenbanken⁴⁴ mindestens 76 putative Gene. Von diesen Genen kommen mehrere als plausible Kandidatengene für die DCM in Betracht. Bisher untersuchten wir die Gene für das Actin-Bindungs-LIM-Protein 1 (ABLIM1), das Nebulin-ähnliche LIM Protein (NRAP) und das Phosphoinositid 5-Phosphatase (INPP5F). Alle diese Gene könnten eine Rolle in der Pathogenese der Myokardfibrose spielen, da ihre Produkte direkt mit der Organisation des Zytoskeletts, mit dem Wachstum und Überleben der Zellen in Zusammenhang gebracht werden können. Bisher konnten wir keine krankheitsverursachende Mutation identifizieren. Eine funktionelle Annotierung des Locus ergab, dass 13 der enthaltenen Gene für Proteine kodieren, die eine Rolle in der Signaltransduktion spielen, zehn erfüllen metabolische Aufgaben, drei sind Transkriptionsfaktoren und drei Gene kodieren für Strukturproteine. Die Funktion der übrigen 39 Gene ist bisher unbekannt. Der von uns gefundene DCM-Locus ist

einer von wenigen bisher identifizierten DCM-Loci, der durch zwei unabhängige Familien definiert wurde. Möglicherweise gelingt es, das Intervall des Locus durch andere DCM-Familien weiter einzugrenzen. Die Identifikation des verursachenden Krankheitsgens könnte helfen, die molekularen Grundlagen der DCM und des plötzlichen Herztodes besser zu verstehen.

Publikationsverzeichnis

Zitierte Publikationen

1. Maron BJ, Towbin JA, Thiene G, Antzelevitch C, Corrado D, Arnett D, Moss AJ, Seidman CE, Young JB; American Heart Association; Council on Clinical Cardiology, Heart Failure and Transplantation Committee; Quality of Care and Outcomes Research and Functional Genomics and Translational Biology Interdisciplinary Working Groups; Council on Epidemiology and Prevention. 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*. 2006 Apr 11;113(14):1807-16.
2. Thiene, G., Nava, A., Corrado, D., Rossi, L. & Pennelli, N. Right ventricular cardiomyopathy and sudden death in young people. *N Engl J Med* **318**, 129-33 (1988).
3. Paul, M., Schulze-Bahr, E., Breithardt, G. & Wichter, T. Genetics of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy--status quo and future perspectives. *Z Kardiol* **92**, 128-36 (2003).
4. Fontaine, G. et al. Arrhythmogenic right ventricular dysplasia. *Annu Rev Med* 50, 17-35 (1999).
5. Coonar AS, Protonotarios N, Tsatsopoulou A, Needham EW, Houlston RS, Cliff S, Otter MI, Murday VA, Mattu RK, McKenna WJ. Gene for arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy with diffuse nonepidermolytic palmoplantar keratoderma and woolly hair (Naxos disease) maps to 17q21. *Circulation*. 1998 May 26;97(20):2049-58.
6. McKoy G, Protonotarios N, Crosby A, Tsatsopoulou A, Anastasakis A, Coonar A, Norman M, Baboonian C, Jeffery S, McKenna WJ. Identification of a deletion in plakoglobin in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy with palmoplantar keratoderma and woolly hair (Naxos disease). *Lancet*. 2000 Jun 17;355(9221):2119-24.
7. Mestroni L, Maisch B, McKenna WJ, et al. Guidelines for the study of familial dilated cardiomyopathies. Collaborative Research Group of the European Human and Capital Mobility Project on Familial Dilated Cardiomyopathy. *Eur Heart J* 1999;20:93-102.
8. Mertens, C., Kuhn, C. & Franke, W.W. Plakophilins 2a and 2b: constitutive proteins of dual location in the karyoplasm and the desmosomal plaque. *J Cell Biol* **135**, 1009-25 (1996).

9. Henry WL, Gardin JM, Ware JH. Echocardiographic measurements in normal subjects from infancy to old age. *Circulation* 1980;62:1054–61.
10. Ott J. *Analysis of Human Genetic Linkage*. Baltimore, MD: The Johns Hopkins University Press, 1991
11. Dib C, Faure S, Fizames C, et al. A comprehensive genetic map of the human genome based on 5,264 microsatellites. *Nature* 1996;380:152–4
12. Green, K.J. & Gaudry, C.A. Are desmosomes more than tethers for intermediate filaments? *Nat Rev Mol Cell Biol* **1**, 208-16 (2000).
13. McGrath, J.A. et al. Mutations in the plakophilin 1 gene result in ectodermal dysplasia/skin fragility syndrome. *Nat Genet* **17**, 240-4 (1997).
14. Grossmann KS, Grund C, Huelsken J, Behrend M, Erdmann B, Franke WW, Birchmeier W. Requirement of plakophilin 2 for heart morphogenesis and cardiac junctionformation. *J Cell Biol*. 2004 Oct 11;167(1):149-60.
15. Syrris P, Ward D, Asimaki A, Sen-Chowdhry S, Ebrahim HY, Evans A, Hitomi N, Norman M, Pantazis A, Shaw AL, Elliott PM, McKenna WJ. Clinical expression of plakophilin-2 mutations in familial arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Circulation*. 2006 Jan 24;113(3):356-64.
16. Pilichou K, Nava A, Basso C, Beffagna G, Bauce B, Lorenzon A, Frigo G, Vettori A, Valente M, Towbin J, Thiene G, Danieli GA, Rampazzo A. Mutations in desmoglein-2 gene are associated with arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Circulation*. 2006 Mar 7;113(9):1171-9.
17. van Tintelen JP, Entius MM, Bhuiyan ZA, Jongbloed R, Wiesfeld AC, Wilde AA, van der Smagt J, Boven LG, Mannens MM, van Langen IM, Hofstra RM, Otterspoor LC, Doevendans PA, Rodriguez LM, van Gelder IC, Hauer RN. Plakophilin-2 mutations are the major determinant of familial arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy. *Circulation*. 2006 Apr 4;113(13):1650-8.
18. Dalal D, Molin LH, Piccini J, Tichnell C, James C, Bomma C, Prakasa K, Towbin JA, Marcus FI, Spevak PJ, Bluemke DA, Abraham T, Russell SD, Calkins H, Judge DP. Clinical features of arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy associated with mutations in plakophilin-2. *Circulation*. 2006 Apr 4;113(13):1641-9.
19. Nagaoka I, Matsui K, Ueyama T, Kanemoto M, Wu J, Shimizu A, Matsuzaki M, Horie M. Novel mutation of plakophilin-2 associated with arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Circ J*. 2006 Jul;70(7):933-5.

20. Kannankeril PJ, Bhuiyan ZA, Darbar D, Mannens MM, Wilde AA, Roden DM. Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy due to a novel plakophilin 2 mutation: wide spectrum of disease in mutation carriers within a family. *Heart Rhythm*. 2006 Aug;3(8):939-44.
21. Basso C, Czarnowska E, Della Barbera M, Bauce B, Beffagna G, Wlodarska EK, Pilichou K, Ramondo A, Lorenzon A, Wozniak O, Corrado D, Daliento L, Danieli GA, Valente M, Nava A, Thiene G, Rampazzo A. Ultrastructural evidence of intercalated disc remodelling in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy: an electron microscopy investigation on endomyocardial biopsies. *Eur Heart J*. 2006 Aug;27(15):1847-54.
22. Antoniadis L, Tsatsopoulou A, Anastasakis A, Syrris P, Asimaki A, Panagiotakos D, Zambartas C, Stefanadis C, McKenna WJ, Protonotarios N. Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy caused by deletions in plakophilin-2 and plakoglobin (Naxos disease) in families from Greece and Cyprus: genotype-phenotype relations, diagnostic features and prognosis. *Eur Heart J*. 2006 Sep;27(18):2208-16.
23. Dalal D, James C, Devanagondi R, Tichnell C, Tucker A, Prakasa K, Spevak PJ, Bluemke DA, Abraham T, Russell SD, Calkins H, Judge DP. Penetrance of mutations in plakophilin-2 among families with arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol*. 2006 Oct 3;48(7):1416-24.
24. Awad MM, Dalal D, Tichnell C, James C, Tucker A, Abraham T, Spevak PJ, Calkins H, Judge DP. Recessive arrhythmogenic right ventricular dysplasia due to novel cryptic splice mutation in PKP2. *Hum Mutat*. 2006 Nov;27(11):1157.
25. Lahtinen AM, Lehtonen A, Kaartinen M, Toivonen L, Swan H, Widen E, Lehtonen E, Lehto VP, Kontula K. Plakophilin-2 missense mutations in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Int J Cardiol*. 2007 May 21.
26. Garrod DR, Merritt AJ, Nie Z (2002) Desmosomal cadherins. *Curr Opin Cell Biol* 14:537–455
27. Jamora C, Fuchs E (2002) Intercellular adhesion, signalling and the cytoskeleton. *Nat Cell Biol* 4:E101–E108
28. Rickman L, Simrak D, Stevens HP, Hunt DM, King IA, Bryant SP, Eady RA, Leigh IM, Arnemann J, Magee AI, Kelsell DP, Buxton RS (1999) N-terminal deletion in a desmosomal cadherin causes the autosomal dominant skin disease striate palmoplantar keratoderma. *Hum Mol Genet* 8:971–976
29. Overduin M, Harvey TS, Bagby S, Tong KI, Yau P, Takeichi M, Ikura M (1995) Solution structure of the epithelial cadherin domain responsible for selective cell adhesion. *Science* 267: 386–389

30. Hanakawa Y, Amagai M, Shirakata Y, Sayama K, Hashimoto K (2000) Different effects of dominant negative mutants of desmocollin and desmoglein on the cell-cell adhesion of keratinocytes. *J Cell Sci* 113:1803–1811
31. Pilichou K, Nava A, Basso C, Beffagna G, Bauce B, Lorenzon A, Frigo G, Vettori A, Valente M, Towbin J, Thiene G, Danieli GA, Rampazzo A (2006) Mutations in desmoglein-2 gene are associated with arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Circulation* 113:1171–1179
32. Garcia-Gras E, Lombardi R, Giocondo MJ, Willerson JT, Schneider MD, Khoury DS, Marian AJ. Suppression of canonical Wnt/beta-catenin signaling by nuclear plakoglobin recapitulates phenotype of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *J Clin Invest.* 2006 Jul;116(7):2012-21.
33. Vatta M, Mohapatra B, Jimenez S, et al. Mutations in Cypher/ZASP in patients with dilated cardiomyopathy and left ventricular noncompaction. *J Am Coll Cardiol* 2003;42:2014 –27.
34. Mohiddin SA, Lu S, Cardoso JP, et al. Genomic organization, alternative splicing, and expression of human and mouse N-RAP, a nebulin-related LIM protein of striated muscle. *Cell Motil Cytoskeleton* 2003;55:200 –12.
35. Bowles KR, Gajarski R, Porter P, et al. Gene mapping of familial autosomal dominant dilated cardiomyopathy to chromosome 10q21-23. *J Clin Invest* 1996;98:1355– 60.
36. Seidman JG, Seidman C. The genetic basis for cardiomyopathy: from mutation identification to mechanistic paradigms. *Cell* 2001;104:557–67.
37. Morita H, Seidman J, Seidman CE. Genetic causes of human heart failure. *J Clin Invest* 2005;115:518 – 26.
38. Keating MT, Sanguinetti MC. Molecular and cellular mechanisms of cardiac arrhythmias. *Cell* 2001;104:569–80.
39. Towbin JA, Bowles NE. Molecular genetics of left ventricular dysfunction. *Curr Mol Med* 2001;1:81– 90.
40. Lee AH, Gray PB, Gallagher PJ. Sudden death and regional left ventricular fibrosis with fibromuscular dysplasia of small intramyocardial coronary arteries. *Heart* 2000;83:101–2.
41. Wheeler MT, Korcarz CE, Collins KA, et al. Secondary coronary artery vasospasm promotes cardiomyopathy progression. *Am J Pathol* 2004;164:1063–71.

42. Arber S, Hunter JJ, Ross J Jr., et al. MLP-deficient mice exhibit a disruption of cardiac cytoarchitectural organization, dilated cardiomyopathy, and heart failure. *Cell* 1997;88:393–403.
43. Pashmforoush M, Pomies P, Peterson KL, et al. Adult mice deficient in actinin-associated LIM-domain protein reveal a developmental pathway for right ventricular cardiomyopathy. *Nat Med* 2001;7:591–7.
44. Kent WJ, Sugnet CW, Furey TS, et al. The human genome browser at UCSC. *Genome Res* 2002;12:996–1006.

Eigene Publikationen

(kumulativer Impactfaktor, Stand 2006: 65,63)

1. Sabine Sasse-Klaassen, Susanne Probst, Brenda Gerull, Erwin Oechslin, Peter Nürnberg, **Arnd Heuser**, Rolf Jenni, Hans Christian Hennies and Ludwig Thierfelder Novel Gene Locus for Autosomal Dominant Left Ventricular Noncompaction Maps to Chromosome 11p15
Circulation 2004;109;2720-2723. **CI: 10,94**
2. **Heuser A***, Gerull B*, Wichter T, Paul M, Basson CT, McDermott DA, Lerman BB, Markowitz SM, Ellinor PT, MacRae CA, Peters S, Grossmann KS, Drenckhahn J, Michely B, Sasse-Klaassen S, Birchmeier W, Dietz R, Breithardt G, Schulze-Bahr E, Thierfelder L. Mutations in the desmosomal protein plakophilin-2 are common in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy.
Nat Genet. 2004 Nov;36(11):1162-4. **CI: 24,17**
3. Schmidtman A, Lindow C, Villard S, **Heuser A**, Mugge A, Gessner R, Granier C, Jaquet K. Cardiac troponin C-L29Q, related to hypertrophic cardiomyopathy, hinders the transduction of the protein kinase A dependent phosphorylation signal from cardiac troponin I to C.
FEBS J. 2005 Dec;272(23):6087-97. **CI: 3,03**
4. Patrick T. Ellinor, Sabine Sasse-Klaassen, Susanne Probst, Brenda Gerull, Jordan T. Shin, Andrea Toepfel, **Arnd Heuser**, Beate Michely, Danita M. Yoerger, Bong-Seok Song, Gregor Krings, Bruce Coplin, Peter E. Lange, G. William Dec, Hans Christian Hennies, Ludwig Thierfelder, Calum A. MacRae A Novel Locus for Dilated Cardiomyopathy, Diffuse Myocardial Fibrosis and Sudden Death on Chromosome 10q25-26
J Am Coll Cardiol. 2006 Jul 4;48(1):106-11. **CI: 9,70**
5. Gerull B, Atherton J, Geupel A, Sasse-Klaassen S, **Heuser A**, Frenneaux M, McNabb M, Granzier H, Labeit S, Thierfelder L. Identification of a novel frameshift mutation in the giant muscle filament titin in a large Australian family with dilated cardiomyopathy.
J Mol Med. 2006 Jun;84(6):478-83 **CI: 5,16**
6. **Arnd Heuser***, Eva R. Plovie*, Patrick T. Ellinor, MD, Katja S. Grossmann, Jordan T. Shin, Thomas Wichter, Craig T. Basson, Bruce B. Lerman, Sabine Sasse-Klaassen, Ludwig Thierfelder, Calum A. MacRae, Brenda Gerull Mutant Desmocollin-2 Causes Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy
Am J Hum Genet. 2006 Dec;79(6):1081-8 **CI: 12,63**

* Doppel-Erstautorenschaft

Danksagung

Recht herzlich bedanke ich mich bei meinen Eltern für die moralische Unterstützung. Sie haben mir während meiner Promotionszeit immer zur Seite gestanden.

Für alle technischen Hilfen im Labor und wissenschaftlichen Unterstützungen möchte ich mich bei Ilona Trippmacher, Sigrid Milan und Constanze Nandy bedanken.

Danken möchte ich ebenfalls Brenda Gerull und Sabine Klaassen für sehr gute Zusammenarbeit, die auch über diese Arbeit noch hinausgehen wird.

Katja Grossmann danke ich für viele Stunden der Diskussion meiner Ergebnisse, die guten Ratschläge und ein wirklich immer offenes Ohr.

Schließlich gilt mein besonderer Dank Herrn Prof. Ludwig Thierfelder für seine wohlwollende Unterstützung, wissenschaftliche Beratung sowie für die Möglichkeit an aus- und inländischen Kongressen und Aufenthalten teilzunehmen und mich selbst wie auch meine Vorliebe für die Wissenschaft zu fördern.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, Arnd Heuser, an Eides Statt, dass diese Dissertation von mir selbst und ohne die unzulässige Hilfe Dritter verfasst wurde, dass die Dissertation auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten darstellt und die benutzten Hilfsmittel sowie die Literatur vollständig an entsprechender Stelle in der Arbeit angegeben sind.

Erklärung über den Anteil an den Publikationen

Mutations in the desmosomal protein plakophilin-2 are common in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy.

Heuser A*, Gerull B*, Wichter T, Paul M, Basson CT, McDermott DA, Lerman BB, Markowitz SM, Ellinor PT, MacRae CA, Peters S, Grossmann KS, Drenckhahn J, Michely B, Sasse-Klaassen S, Birchmeier W, Dietz R, Breithardt G, Schulze-Bahr E, Thierfelder L.

Nat Genet. 2004 Nov;36(11):1162-4. CI: 24,17

Bei dieser Publikation führte ich die DNA-Isolation, das Mutationsscreening von Plakophilin 2, die Western-Blot-Analysen der Herzbiopsien und die RNA-Experimente durch.

Mutant Desmocollin-2 Causes Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy.

Arnd Heuser*, Eva R. Plovie*, Patrick T. Ellinor, MD, Katja S. Grossmann, Jordan T. Shin, Thomas Wichter, Craig T. Basson, Bruce B. Lerman, Sabine Sasse-Klaassen, Ludwig Thierfelder, Calum A. MacRae, Brenda Gerull

Am J Hum Genet. 2006 Dec;79(6):1081-8 CI: 12,63

Bei dieser Publikation führte ich das Mutationsscreening der Kandidatengene Desmocollin 2 und Desmoglein 2, die Westernblot-Analysen der Herzbiopsien die quantitativen Realtime-Experimente und die histologischen Untersuchungen durch. Des Weiteren klonierte ich die Vektoren für die Zebrafisch-Experimente. Generell hatte ich bei den oben genannten Publikationen sowohl bei der Projektplanung als auch bei der Erstellung der Manuskripte einen wesentlichen Anteil.

A Novel Locus for Dilated Cardiomyopathy, Diffuse Myocardial Fibrosis and Sudden Death on Chromosome 10q25-26

Patrick T. Ellinor, Sabine Sasse-Klaassen, Susanne Probst, Brenda Gerull, Jordan T. Shin, Andrea Toepfel, Arnd Heuser, Beate Michely, Danita M. Yoerger, Bong-Seok Song, Gregor Krings, Bruce Coplin, Peter E. Lange, G. William Dec, Hans Christian Hennies, Ludwig Thierfelder, Calum A. MacRae

J Am Coll Cardiol. 2006 Jul 4;48(1):106-11. CI: 9,70

Hier führte ich Teile der Kopplungsanalyse der DCM100 Familie und des Mutationsscreenings durch.

Lebenslauf

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