

Aus dem Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin (MDC)
Berlin-Buch

DISSERTATION

Mutationsanalyse an 14 Kandidatengenen für autosomal-
dominant vererbte arrhythmogene rechtsventrikuläre
Kardiomyopathie (ARVD5)

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Kalina Brandt

aus Sofia

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. L. Thierfelder
 2. Prof. Dr. med. Ch. Hengstenberg
 3. Prof. Dr. Dr. med. S.-M. Brand-Herrmann

Datum der Promotion: 09.09.2011

I. Einleitung	7
1.1 Das Krankheitsbild der ARVC	7
1.2 Pathogenese und Ätiologie der Erkrankung	7
1.3 Krankheitsverlauf und Diagnostik	8
1.4 Genetische Grundlagen der ARVC	14
1.4.1 ARVC-Krankheitsgenloci und nicht desmosomale ARVC-Krankheitsgene	14
1.4.2 Desmosomale ARVC-Krankheitsgene	18
1.5 Vorarbeiten zur vorliegenden Arbeit	22
1.5.1 Phänotypisierung und molekulargenetische Charakterisierung von 15 kanadischen ARVC-Familien	22
1.6 Zielstellung der Arbeit und eigene molekulargenetische Untersuchungen	26
II. Material und Methoden	28
2.1 Material	28
2.1.1 Standardpuffer und Lösungen	28
2.1.2 Stammlösungen (nach Sambrook et al., 1989)	28
2.1.3 Medien	29
2.1.4 Plasmidvektoren	29
2.1.5 Bakterienstämme	29
2.2 Methoden	29
2.2.1 Isolierung von Nukleinsäuren	29
2.2.1.1 Isolierung von humaner genomischer DNA aus Lymphozyten	29
2.2.1.2 Isolierung von Gesamt-RNA aus Herzgewebe	30
2.2.1.3 DNA- bzw. RNA-Konzentrationsbestimmung	30
2.2.1.4 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	31
2.2.1.5 Isolierung von Plasmid-DNA (Minipräparation)	31
2.2.1.6 Isolierung von Plasmiden im großen Maßstab (Midipräparation)	32
2.2.2 Fällung von Nukleinsäuren	33
2.2.3 PCR (Polymerase-Kettenreaktion)	33
2.2.3.1 PCR an humaner genomischer DNA	34
2.2.3.2 Reverse-Transkriptase-PCR (RT-PCR)	35
2.2.3.3 PCR an komplementärer DNA (cDNA)	36
2.2.3.4 Nested-PCR an humaner cDNA	37
2.2.4 Agarosegelelektrophorese	37
2.2.5 Klonierungstechniken	38
2.2.5.1 TA-Klonierung	38
2.2.5.2 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen	39
2.2.5.3 Klonierung von DNA-Fragmenten in pBlueScript	41
2.2.6 DNA-Sequenzierungen	41
2.2.7 DHPLC (Denaturing High Performance Liquid Chromatography)	43
2.2.7.1 Beschreibung und Versuchsbedingungen	43
2.2.7.2 Auswertung der Ergebniskurven	46
2.2.8 Southern-Blot-Analysen	46
2.2.8.1 Restriktionsverdau für Southern-Blot-Analysen	46
2.2.8.2 Southern Blot	47
2.2.9 Herstellung radioaktiver DNA-Sonden	48
2.2.10 Hybridisierungstechniken	49
2.2.10.1 Hybridisierung von Southern-Blot-Membranen mit radioaktiv markierten DNA-Sonden	49
2.2.10.2 Koloniehybridisierung	50
2.2.11 Northern Blot	50
III. Ergebnisse	52
3.1 Das Fibulin-2-Gen	52
3.1.1 Beschreibung und Funktion des <i>Fibulin-2-Gens</i>	52
3.1.2 Mutationsscreening und molekulargenetische Analysen des <i>Fibulin-2-Gens</i>	53
3.1.2.1 Analyse des Fibulin-2-Gens auf genomischer und cDNA-Ebene	53

3.1.2.2	Southern Blot des Fibulin-2-Gens	54
3.1.2.3	Untersuchung zur Expression des Fibulin-2-Gens in verschiedenen menschlichen Geweben (Northern Blot)	56
3.1.2.4	Mutationsscreening mittels denaturierender Hochdruckflüssigkeitschromatographie (DHPLC) an 94 Kontrollpersonen	56
3.2	Das WNT7A-Gen (wingless-type MMTV integration site family, member 7A)	58
3.2.1	Beschreibung und Funktion des <i>WNT7A-Gens</i>	58
3.2.2	Mutationsscreening und molekulargenetische Analysen des <i>WNT7A-Gens</i>	60
3.2.2.1	Analyse des WNT7A-Gens auf genomischer und cDNA-Ebene	60
3.2.2.2	Southern Blot des WNT7A-Gens	61
3.3	Das HDAC11-Gen (Histone deacetylase 11-gene)	62
3.3.1	Beschreibung und Funktion des <i>HDAC11-Gens</i>	62
3.3.2	Mutationsscreening und molekulargenetische Analysen des <i>HDAC11-Gens</i>	65
3.3.2.1	Analyse des HDAC11-Gens auf genomischer und cDNA-Ebene	65
3.3.2.2	Southern Blot des HDAC11-Gens	67
3.3.2.3	Untersuchung zur Expression des HDAC11-Gens in verschiedenen menschlichen Geweben (Northern Blot)	68
3.4	Das SLC6A6-Gen (solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, taurine), member 6)	69
3.4.1	Beschreibung und Funktion des <i>SLC6A6-Gens</i>	69
3.4.2	Mutationsscreening und molekulargenetische Analysen des <i>SLC6A6-Gens</i>	71
3.4.2.1	Analyse des SLC6A6-Gens auf genomischer und cDNA-Ebene	71
3.4.2.2	Southern Blot des SLC6A6-Gens	74
3.5	Das GRIP2-Gen (glutamate receptor interacting protein 2)	75
3.5.1	Beschreibung und Funktion des <i>GRIP2-Gens</i>	75
3.5.2	Mutationsscreening und molekulargenetische Analysen des <i>GRIP2-Gens</i>	77
3.5.2.1	Analyse des GRIP2-Gens auf genomischer und cDNA-Ebene	77
3.5.2.2	Southern Blot des GRIP2-Gens	81
3.6	Das NUP210-Gen (nucleoporin 210 kDa, GP210; POM210; FLJ22389; KIAA0906)	82
3.6.1	Beschreibung und Funktion des <i>NUP210-Gens</i>	82
3.6.2	Mutationsscreening und molekulargenetische Analysen des <i>NUP210-Gens</i>	84
3.6.2.1	Analyse des NUP210-Gens auf genomischer und cDNA-Ebene	84
3.6.2.2	Southern Blot des NUP-210-Gens	87
3.7	Das TMEM43-Gen (MGC3222; DKFZp586G1919)	87
3.7.1	Beschreibung und Funktion des <i>TMEM43-Gens</i>	87
3.7.2	Mutationsscreening und molekulargenetische Analysen des <i>TMEM43-Gens</i>	88
3.7.2.1	Analyse des TMEM43-Gens auf genomischer und cDNA-Ebene	88
3.7.2.2	Southern Blot des TMEM43-Gens	91
3.8	Das CHCHD4-Gen (coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain containing 4)	92
3.8.1	Beschreibung und Funktion des <i>CHCHD4-Gens</i>	92
3.8.2	Mutationsscreening und molekulargenetische Analysen des <i>CHCHD4-Gens</i>	94
3.8.2.1	Analyse des CHCHD4-Gens auf genomischer und cDNA-Ebene	94
3.8.2.2	Untersuchung zur Expression des CHCHD4-Gens in verschiedenen menschlichen Geweben (Northern Blot)	94
3.8.2.3	Southern Blot des CHCHD4-Gens	94
3.9	Das TPRXL-Gen (tetra-peptide repeat homeobox-like)	95
3.9.1	Beschreibung und Funktion des <i>TPRXL-Gens</i>	95
3.9.2	Mutationsscreening und molekulargenetische Analysen des <i>TPRXL-Gens</i>	96
3.9.2.1	Analyse des TPRXL-Gens auf genomischer und cDNA-Ebene	96
3.10	Das LSM3-Gen (Sm-like-3-gene)	98
3.10.1	Beschreibung und Funktion des <i>LSM3-Gens</i>	98
3.10.2	Mutationsscreening und molekulargenetische Analysen des <i>LSM3-Gens</i>	99
3.10.2.1	Analyse des LSM3-Gens auf genomischer und cDNA-Ebene	99
3.11	Das XPC-Gen (Xeroderma pigmentosum, complementation group C)	99

3.11.1	Beschreibung und Funktion des <i>XPC-Gens</i>	99
3.11.2	Mutationsscreening und molekulargenetische Analysen des <i>XPC-Gens</i>	101
3.11.2.1	Analyse des <i>XPC-Gens</i> auf cDNA-Ebene	101
3.12	Das C3orf19-Gen (chromosome 3 open reading frame 19; Hematopoietic stem/progenitor cells-gene, HSPC212; FLJ33839)	101
3.12.1	Beschreibung und Funktion des <i>C3orf19-Gens</i>	101
3.12.2	Mutationsscreening und molekulargenetische Analysen des <i>C3orf19-Gens</i>	102
3.12.2.1	Analyse des C3orf19-Gens auf genomischer und cDNA-Ebene	102
3.12.2.2	Untersuchung zur Expression des C3orf19-Gens in verschiedenen menschlichen Geweben (Northern Blot)	104
3.13	Das C3orf20-Gen (chromosome 3 open reading frame 20; DKFZP434N1817)	105
3.13.1	Beschreibung und Funktion des <i>C3orf20-Gens</i>	105
3.13.2	Mutationsscreening und molekulargenetische Analysen des <i>C3orf20-Gens</i>	106
3.13.2.1	Analyse des C3orf20-Gens auf genomischer und cDNA-Ebene	106
3.14	LOC 285375	107
3.14.1	Beschreibung und Funktion von <i>LOC 285375</i>	107
3.14.2	Mutationsscreening und molekulargenetische Analysen von <i>LOC 285375</i>	108
3.14.2.1	Analyse von LOC 285375 auf genomischer und cDNA-Ebene	108
IV.	Diskussion	110
4.1	Kandidatengene	110
4.1.1	Das Fibulin-2-Gen	110
4.1.2	Das WNT7A-Gen	111
4.1.3	Das HDAC11-Gen	111
4.1.4	Das SLC6A6-Gen	111
4.1.5	Das GRIP2-Gen	111
4.1.6	Das NUP210-Gen	112
4.1.7	Das TMEM43-Gen	112
4.1.8	Das CHCHD4-Gen	112
4.1.9	Das TPRXL-Gen	113
4.1.10	Das LSM3-Gen	113
4.1.11	Das <i>XPC-Gen</i>	113
4.1.12	Das C3orf19-Gen	113
4.1.13	Das C3orf20-Gen	113
4.1.14	LOC 285375	114
4.2	Polymorphismen	114
4.2.1	Einzelnukleotidpolymorphismen (SNP)	114
4.2.2	Deletions- und Insertionspolymorphismen	117
4.3	Alternative Spleißformen	118
4.3.1	Exondeletion/Exonskipping	118
4.3.2	Intronretention	119
4.3.3	Alternative 5'-Donor- und 3'-Akzeptorspleißstellen	120
4.4	Methodenspezifische Probleme der Polymerase-Kettenreaktion	121
4.5	Mutation im TMEM43-Gen führt zu ARVD5	122
V.	Zusammenfassung	125
VI.	Literaturverzeichnis	127
VII.	Klone und Sequenzen	139
7.1	Genomische Klone	139
7.2	Kodierende Sequenzen	139
7.3	Proteine	140
VIII.	Abkürzungsverzeichnis	141

Meinen Eltern gewidmet

I. Einleitung

1.1 Das Krankheitsbild der ARVC

Kardiomyopathien sind heterogene Erkrankungen des Herzmuskelgewebes, welche mit einer kardialen Funktionsstörung einhergehen und nach hämodynamischen und makroskopischen Kriterien in dilatative, hypertrophische, restriktive, arrhythmogen rechtsventrikuläre und nichtklassifizierbare Formen unterteilt werden. Die arrhythmogene rechtsventrikuläre Kardiomyopathie/Dysplasie (ARVC), die in die Kategorie der primären Kardiomyopathien eingeordnet werden kann (Marcus & Fontaine, 1995), wurde dieser klinisch-pathophysiologischen Einteilung im Jahr 1995 durch die WHO/ISFC Task Force hinzugefügt (Richardson *et al.*, 1996).

Seit der Erstbeschreibung der ARVC durch Dalla Volta *et al.* (1961), und der Charakterisierung der Erkrankung durch Fontaine *et al.* 1977, haben sich viele Berichte über ein familiäres Auftreten gehäuft (Marcus *et al.*, 1982, Laurent *et al.*, 1987, Nava *et al.*, 1988 und Nava *et al.*, 1990). Nava *et al.* (1988) vermuteten einen autosomal-dominanten Erbgang mit variabler Penetranz und polymorphem Phänotyp. Eine genetische Genese soll in 30-50% der ARVC-Fälle mit meist autosomal-dominantem Erbgang vorliegen (Corrado *et al.*, 2000). Über die Prävalenz und Inzidenz dieser Erkrankung liegen zurzeit keine gesicherten Daten vor. Die Prävalenz wird auf 1:5000 geschätzt. Die hohe Inzidenz von ARVC in Norditalien (Corrado *et al.* 1990, 1998) konnte in Studien aus Nordamerika und China nicht bestätigt werden (Burke *et al.*, 1998, Fung *et al.*, 2001). Die Unterschiede in der Prävalenz könnten entweder durch ein gehäuftes Auftreten der Erkrankung in bestimmten Regionen oder durch eine klinische und pathologische Fehldiagnose bedingt sein (Thiene *et al.*, 1997).

1.2 Pathogenese und Ätiologie der Erkrankung

Pathoanatomisch ist die ARVC durch eine progrediente Myozytendegeneration mit fettigem bzw. fibrös-fettigem Ersatz vorwiegend der rechtsventrikulären freien Wand charakterisiert. Diese histologischen Veränderungen können zu einer elektrischen Instabilität, einer Atrophie und/oder Dilatation des rechten Ventrikels und/oder zur Entstehung von Aneurysmata führen (Marcus *et al.*, 1982, Thiene *et al.*, 1988, Lobo *et al.*, 1992, Basso *et al.*, 1996). Die segmentale oder diffuse Involution des Myokards

erfolgt erst postnatal und betrifft vorwiegend den Bereich unterhalb des anterioren Segels der Trikuspidalklappe, das Infundibulum, die Apex und den Ausflusstrakt des rechten Ventrikels (Markus-Dreieck) (Fontaine et al., 1998). In schweren Fällen kann die gesamte muskuläre Wand des rechten Ventrikels durch den fettig-fibrösen Ersatz befallen sein. Außerdem kann sich der Krankheitsprozess in späteren Stadien auf den linken Ventrikel ausdehnen und durch die biventrikuläre Dysplasie zu einer Herzinsuffizienz führen.

Der vom Subepikard ausgehende pathologische Prozess setzt sich wellenartig bis in das Endokard fort (Thiene et al., 2001). Histologisch findet man in zweidrittel der Fälle mit fibrös-fettigem Ersatz zunächst inflammatorische Infiltrate und einen Zelluntergang von Kardiomyozyten unter Beteiligung von Lymphozyten und Makrophagen. Die aus CD43 positiven T-Lymphozyten bestehenden inflammatorischen Infiltrate könnten auf eine assoziierte Myokarditis hinweisen (Basso et al., 1996, Thiene et al., 1991).

Die Ätiopathogenese der ARVC ist noch weitgehend ungeklärt. Vornehmlich sollen folgende drei Mechanismen für die Myozytenschädigung verantwortlich sein: Apoptose der Myozyten (Mallat et al., 1996, Valente et al., 1998), inflammatorische Prozesse in Form einer Myokarditis und eine genetisch determinierte myokardiale Dystrophie (Thiene et al., 1991, Basso et al., 1996). Diese Mechanismen könnten auch Teilprozesse eines Gesamtvorgangs sein. Die Apoptose könnte über proinflammatorische Zytokine aus Lymphozyten und proapoptotische Proteine durch eine Myokarditis getriggert werden (Colston et al., 1998). Grumbach et al. (1998) berichteten außerdem über einen Myokardbefall durch Coxsackie-B3-Viren in einigen ARVC-Patienten. Ob kardiotope Viren in der Pathogenese der Erkrankung eine Rolle spielen oder das bereits geschädigte Herz für solche Infektionen empfänglicher ist, bleibt noch ungeklärt (Bowles et al., 2001).

Wichter et al. (1994, 2000) berichteten über ein Ungleichgewicht der kardialen sympathischen Innervation bei ARVC-Patienten, welche zu De- und Repolarisationsstörungen und einem daraus resultierenden Arrhythmiepotenzial führen soll.

1.3 Krankheitsverlauf und Diagnostik

Die Manifestation der ARVC erfolgt meist zwischen dem 16.-35. Lebensjahr (Nava et al., 2000) und betrifft häufiger Männer mit einer Ratio von ca. 3:1 (Marcus et al., 1982). Einige wenige pädiatrische Fälle sind ebenfalls beschrieben worden (Dungan et al.,

1981, Pawel et al., 1994). Li et al. (2000) berichteten über eine pathologische oder klinische Manifestation der Erkrankung bereits bei Kindern unter 10 Jahren in einer nordamerikanischen Familie mit autosomal-dominantem Erbgang.

Als Folge der progredienten Myozytendegeneration des rechten Ventrikels und der konsekutiven Bindegewebs- und Fetteinlagerung können ventrikuläre Herzrhythmusstörungen unterschiedlicher Form und Ausprägung (Extrasystolen, linksschenkelblockartige ventrikuläre Tachykardien, Kammerflimmern), eine fortschreitende Herzinsuffizienz und der plötzliche Herztod resultieren. Die rechtsventrikuläre Herzinsuffizienz kann in späteren Stadien unter Beteiligung des linken Ventrikels in eine globale Herzinsuffizienz übergehen, welche mit oder ohne Herzrhythmusstörungen einhergehen kann und zu Komplikationen wie Vorhofflimmern und thromboembolische Ereignisse führen kann. Die Symptomatik kann sich durch Palpitationen, Synkopen, Schwindel und/oder Schwächeanfälle äußern. Durch die variable Penetranz und den heterogenen Phänotyp der Erkrankung, der sogar innerhalb einer Familie erheblich variieren kann (Nava et al., 1987), werden sehr unterschiedliche klinische Manifestationen beobachtet. Neben symptomatischen Patienten können asymptomatische Fälle auftreten, die entweder bei einem systematischen Familienscreening entdeckt werden oder als Erstmanifestation der Erkrankung einen plötzlichen Herztod aufgrund von ventrikulären Tachykardien und Kammerflimmern erleiden. Ähnlich der regional unterschiedlichen Prävalenzraten von ARVC wird das Risiko, am plötzlichen Herztod zu sterben, verschieden eingeschätzt. Eine italienische pathoanatomische Studie über den plötzlichen Herztod in der Adoleszenz zeigte, dass 20% der Herzstillstände von jungen Erwachsenen und Athleten auf einer noch nicht diagnostizierten ARVC basierten (Thiene et al., 1988). Hingegen wurde in einer vergleichbaren Studie aus den USA in weniger als 1% der Todesfälle eine ARVC als Ursache gefunden (Maron et al., 1996).

Das Fehlen von Herzrhythmusstörungen im Zusammenhang mit einer biventrikulären Herzinsuffizienz bei ARVC stellt eine Differentialdiagnose zur idiopathischen dilatativen Kardiomyopathie (DCM) dar und kann fehlinterpretiert werden (Girard et al., 1997, Nemeč et al., 1999). Im Gegensatz zur ARVC wird bei anderen Kardiomyopathien (DCM, HCM) zunächst der linke Ventrikel in den Krankheitsprozess involviert (Marian und Roberts, 1995) und führt zur Linksherzinsuffizienz.

Die Abgrenzung der ARVC gegenüber der rechtsventrikulären Ausflusstrakttachykardie und dem Morbus Uhl führt zu weiteren differentialdiagnostischen Überlegungen

(Marcus, 1997). Eine Differenzierung kann aufgrund der nicht vorhandenen familiären Häufung und Geschlechtspräferenz bei Morbus Uhl erfolgen (Kayser et al., 2002). Alternativ könnte es sich bei der Uhl-Anomalie, welche aufgrund des beinahe vollständigen Fehlens von myokardialen Muskelfasern durch eine papierdünne rechtsventrikuläre Wand charakterisiert ist (Fontaine et al., 1998, Markus et al., 1995), um eine Maximalvariante der ARVC handeln. Die idiopathische rechtsventrikuläre Ausflusstrakttachykardie ist eine benigne Erkrankung ohne genetische Komponenten und ohne strukturelle Veränderungen.

Aus den bereits beschriebenen Symptomen wird deutlich, dass eine frühe und genaue Diagnosestellung einer ARVC mit folgender adäquater Therapie eine große Bedeutung für die Prävention von letalen Arrhythmien hat. Die Diagnose der ARVC wird mit Hilfe von Haupt- und Nebenkriterien gestellt, welche aus strukturellen, histologischen, elektrokardiographischen, rhythmologischen und genetischen Faktoren bestehen, und zu einem Score zusammengefasst werden. Das Zusammentreffen von zwei Hauptkriterien, ein Haupt- und zwei Nebenkriterien oder vier Nebenkriterien führt zur Diagnose der ARVC (McKenna et al., 1994), Tab. 1.1. Die modifizierten Diagnosekriterien wurden von Hamid et al. (2002) vorgeschlagen, um ARVC-Patienten bereits in einem frühen Krankheitsstadium bzw. mit einer mildereren Erkrankungsform erfassen zu können (Tab. 1.2).

Diagnosekriterien	Hauptkriterien	Nebenkriterien
Globale und/oder regionale rechtsventrikuläre Dysfunktion	<ul style="list-style-type: none"> - schwere Dilatation des rechten Ventrikels und Reduktion der EF ohne Beteiligung des linken Ventrikels - lokalisierte rechtsventr. Aneurysmata - schwere segmentale Dilatation des rechten Ventrikels 	<ul style="list-style-type: none"> - milde globale rechtsventr. Dilatation und/oder Reduktion der EF ohne Beteiligung des linken Ventrikels - milde segmentale Dilatation des rechten Ventrikels - Hypokinesie der rechtsventrikulären Wand
Gewebecharakterisierung (Biopsie)	Fibrolipomatose	
Repolarisationsstörungen		Rechtspräkordiale T-Inversion in V ₂ und V ₃
Depolarisations- und Leitungsstörungen	Epsilon-Welle oder verlängerte QRS-Dauer (>110 ms) in den	Spätpotentiale im Signalmittelungs-EKG

	rechtspräkordialen Ableitungen (V ₁ -V ₃)	
Ventrikuläre Arrhythmien		- linksschenkelblockartige ventrikuläre Tachykardien - gehäufte ventrikuläre Extrasystolen (mehr als 1000/24 h)
Familiengeschichte	Familiäre Erkrankung, die mittels Biopsie oder Autopsie gesichert wurde	- Vorkommen von plötzlichem Herztod in der Familiengeschichte, vermutlich basierend auf einer rechtsventrikulären Dysplasie - klinische Diagnose

Tab. 1.1: Diagnosekriterien nach McKenna et al. (1994)

ARVC bei einem Verwandten I° plus eines der folgenden Kriterien:	
EKG	* T-Negativierung in rechtspräkordialen Ableitungen (V ₂ und V ₃)
Signalmittlungs-EKG	* Spätpotentiale
Arrhythmien	* Linksschenkelblockartige ventrikuläre Tachykardien im 12-Kanal-EKG, Holter-EKG oder während Anstrengung * gehäufte ventrikuläre Extrasystolen (> 200/24 h)
Strukturelle oder funktionale Abnormalität des rechten Ventrikels	* Milde globale rechtsventrikuläre Dilatation und/oder Reduktion der Ejektionsfraktion ohne Beteiligung des linken Ventrikels * Milde segmentale Dilatation des rechten Ventrikels * Regionale rechtsventrikuläre Hypokinesien

Tab. 1.2: Modifizierte Diagnosekriterien für genetische ARVC (Hamid et al., 2002)

Neben der Anamnese und den verschiedenen elektrokardiographischen Untersuchungen (12-Kanal-, Belastungs-, Langzeit- und Signalmittlungs-EKG) werden die Echokardiographie und Magnetresonanztomographie (MRT) als nichtinvasive und die elektrophysiologische Herzkatheteruntersuchung, Endomyokardbiopsie und Angiographie als invasive Verfahren zur Etablierung der ARVC-Diagnose verwendet. Im 12-Kanal-EKG findet man in fast allen ARVC-Fällen als Hauptkriterien rechtspräkordiale T-Negativierungen (V₁-V₃) und/oder eine verlängerte QRS-Dauer von mehr als 110 msec (in V₁), seltener eine Epsilon-Welle nach dem QRS-Komplex in V₁. Mit Hilfe des Signalmittlungs-EKGs können Spätpotenziale und die Verbreiterung des hochverstärkten QRS-Komplexes nachgewiesen werden, welche durch eine

rechtsventrikuläre Erregungsleitungs- und Erregungsausbreitungsstörung hervorgerufen werden (Turrini et al., 1999). Im Holter-EKG können linksschenkelblockartige ventrikuläre Tachykardien, deren Ursprung im rechten Ventrikel zu finden ist, nachgewiesen werden.

Typischerweise werden regionale oder globale Kontraktionsstörungen, Hypokinesien sowie eine Dilatation des rechten Ventrikels mittels der Echokardiographie detektiert. Aneurysmata und/oder eine Hypertrabekularisierung können ebenfalls entdeckt werden. Neben einer ventrikulären Dilatation, Aneurysmata und Kontraktionsstörungen kann eine Fibrolipomatose in T₁-gewichteten Aufnahmen durch die MRT identifiziert werden (Auffermann et al., 1993, Menghetti et al., 1996). Als problematisch erweisen sich die Abgrenzung der Lipomatose gegenüber Normalbefunden, die hohe Variabilität zwischen unterschiedlichen Untersuchern und die notwendige Erfahrung bei der Durchführung und Befundinterpretation. Die daraus resultierende niedrige Sensitivität macht die Notwendigkeit einer Standardisierung von Durchführung und Auswertung deutlich.

Die invasive elektrophysiologische Herzkatheteruntersuchung mit programmierter ventrikulärer Stimulation durch intravenöse Katecholamingabe (z.B. Orciprenalin oder Isoproterenol) kann ventrikuläre Tachykardien auslösen und zur Risikostratifizierung beitragen. Der klinische Stellenwert wird bei geringem positivem und negativem Vorhersagewert (Prädiktionswert) heterogen diskutiert.

Die Angiographie, die lange Zeit als Goldstandard gegolten hat, wird aufgrund der Strahlenbelastung und der geringen Sensitivität nicht mehr als primäres Diagnostikverfahren herangezogen. Morphologische Veränderungen, wie Aneurysmata und diastolische Aussackungen („bulging“) mit Kontrastmittelaussparungen, Kontraktionsstörungen sowie eine Hypertrabekularisierung können nachgewiesen werden.

Der histologische Nachweis des fibrolipomatösen Umbaus des rechtsventrikulären Myokards kann anhand der Endomyokardbiopsie erbracht werden. Die disseminierte Ausbreitung der Läsionen und die aus dem Septum entnommene Probe führen zu einer Limitierung der Sensitivität. Die typischen pathologischen Veränderungen betreffen selten das Septum, sondern vorwiegend die rechtsventrikuläre freie Wand (Corrado et al., 2000, Wiesfeld et al., 1994). Nur positive Befunde können als diagnostisch verwertbar interpretiert werden („sampling error“). Aufgrund diagnostischer Alternativen

(MRT) und bedeutsamer potentieller Komplikationen (Herztamponade, Perforation) wird der klinische Stellenwert angezweifelt.

Da keine der genannten Methoden als Goldstandard bezeichnet werden kann, besteht die beste klinische Strategie zur Diagnosesicherung bisher in der Kombination der verschiedenen Untersuchungsverfahren. Trotz der charakteristischen Veränderungen des EKG-Musters, der Herzfunktion in Form von segmentalen bis globalen Kontraktionsstörungen und der Herzmorphologie ist die Erkrankung aufgrund der variablen Expressivität und der geringen Sensitivität der verschiedenen Untersuchungstechniken klinisch oft schwer zu bestätigen. Einige Fälle von ARVC konnten nicht erkannt werden, da sie mit den konventionellen nichtinvasiven Methoden schwer zu diagnostizieren waren (Corrado et al., 1997, Nava et al., 1992).

Die therapeutischen Optionen beinhalten die Anwendung von Antiarrhythmika, die Katheterablation, die Implantation eines ICD (implantierbarer Kardioverter-Defibrillator) und die chirurgische Intervention. Eine durch ARVC ausgelöste Herzinsuffizienz wird zunächst medikamentös (mit Diuretika, ACE-Hemmer, Betablocker und Antikoagulantien) behandelt, wobei in schweren Fällen eine Herztransplantation erwogen werden kann/muss.

Die antiarrhythmische Therapie (β -Blocker, Sotalol, Flecainid, Propafenon und Amiodaron allein oder in Kombination) findet ihre Anwendung bei Patienten ohne lebensbedrohliche Herzrhythmusstörungen und niedrigem proarrhythmogenem Potential. Die pharmakologische Therapie kann von einer programmierten ventrikulären Stimulation mit serieller Medikamententestung begleitet sein, um die Effizienz der Unterdrückung von ventrikulären Arrhythmien im Vergleich zur empirischen Herangehensweise zu erhöhen (Wichter et al., 1992). Hingegen bleibt die Prävention des plötzlichen Herztodes dadurch unbeeinflusst.

ICDs sind Patienten mit hämodynamisch beeinträchtigenden und lebensbedrohlichen ventrikulären Tachykardien, ineffizienter medikamentöser Behandlung oder schweren Nebenwirkungen vorbehalten (Link et al., 1997, Wichter et al., 1997 a/b). Zusätzlich kann die Effektivität der antiarrhythmischen Therapie nach einer Katheterablation gesteigert werden (Movsowitz et al., 1996). Andererseits zeigt die Katheterablation trotz guter Akuterfolge im Langzeitverlauf eine hohe Rate an rezidivierenden ventrikulären Tachykardien durch neue Arrhythmieherde und Progress der Erkrankung. Daher wird diese Therapieform vorwiegend in palliativen Situationen zur Beherrschung therapierefraktärer ventrikulärer Tachykardien verwendet.

Prophylaktisch kann bei asymptomatischen Patienten mit familiärem Auftreten von plötzlichem Herztod ein ICD eingesetzt werden. Obwohl der ICD am effektivsten vor einem plötzlichen Herztod schützt, fehlt bislang eine komplette Risikostratifikation über die Notwendigkeit der ICD-Behandlung (Corrado et al., 2000). Sein Einsatz und die Effizienz der pharmakologischen Therapie müssen in einer Multicenter-Studie mit großem Patientenkollektiv evidenzbasiert evaluiert werden.

Um die bereits beschriebenen diagnostischen und therapeutischen Schwierigkeiten zu beheben, wurden von Corrado et al. (2000) eine internationale Registrierung und von Marcus et al. (2003) eine multidisziplinäre longitudinale Follow-up Studie initialisiert. Durch die Zusammenarbeit verschiedener Zentren und die Registrierung von ARVC-Patienten soll eine Verbesserung der Sensitivität und Spezifität der Untersuchungsmethoden, eine Therapieoptimierung und die Identifizierung der für diese Erkrankung verantwortlichen Mutationen erreicht werden. Aufgrund der Tatsache, dass asymptomatische Patienten auf der Grundlage von genetischen Analysen rechtzeitig erfasst und beobachtet werden können, ist es evident, dass eine genetisch basierte Diagnose eine Vorrangstellung gegenüber den klinischen Methoden in Zukunft einnehmen könnte. Die möglicherweise durch die Erkrankung entstehenden bedeutenden Konsequenzen für nahe Verwandte können vermieden werden, und die Genträger einer Risikostratifizierung unterzogen werden. Ein weiterer Vorteil besteht darin, dass mit dem Bekanntwerden der ARVC-Gene die Pathophysiologie und die molekularen Mechanismen, welche die Voraussetzung für eine optimierte individualisierte Therapie darstellen, verstanden werden könnten.

1.4 Genetische Grundlagen der ARVC

1.4.1 ARVC-Krankheitsgenloci und nicht desmosomale ARVC-Krankheitsgene

Seitdem die ARVC durch Fontaine et al., 1977, klinisch unter dem Namen der „Arrhythmogenen rechtsventrikulären Kardiomyopathie“ charakterisiert wurde, sind sporadische und familiäre Formen der Erkrankung beschrieben worden (Fontaine et al., 1998). In etwa 30-50% der ARVC-Fälle liegt der Erkrankung eine genetische Genese zugrunde, wobei in der Mehrzahl der bisher bekannten chromosomalen Loci ein autosomal-dominanter Erbgang mit polymorphem Phänotyp und variabler Penetranz beschrieben wird. Durch Kopplungsstudien wurden für autosomal-dominante ARVC acht genomische Loci (auf den Chromosomen 14q23-q24 (ARVD1, Rampazzo et al., 1994), 1q42-q43 (ARVD2, Rampazzo et al., 1995), 14q12-q22 (ARVD3, Severini et al.,

1996), 2q32.1-q32.3 (ARVD4, Rampazzo et al., 1997), 3p23 (ARVD5, Ahmad et al., 1998), 10p12-p14 (ARVD6, Li et al., 2000), 10q22.3 (ARVD7, Melberg et al., 1999), 6p24 (ARVD8, Rampazzo et al., 2002)) sowie zwei Loci mit autosomal-rezessivem Erbgang (auf den Chromosomen 17q21 (Coonar et al., 1998) und 6p24 (Norgett et al., 2000)) identifiziert. Weitere krankheitsverursachende genomische Loci für autosomal-dominante ARVC wurden durch genetische Untersuchungen an Kandidatengeneten auf den Chromosomen 12p11 (ARVD9, Gerull et al., 2004), 18q12.1-q12.2 (ARVD10, Pilichou et al., 2006), 18q12.1 (ARVD11, Heuser et al., 2006) und 17q21 (ARVD12, Asimaki et al., 2007) gefunden.

Die erste molekulargenetische Untersuchung führte zur Charakterisierung eines autosomal-dominanten Locus auf Chromosom 14q23-q24 (ARVD1, (Rampazzo et al., 1994)). Der maximale kumulative Multipoint-Lod-Score für den polymorphen Marker D14S42 betrug in zwei italienischen Familien 6.04. Das Krankheitsintervall umfasst eine Region von ca. 10 cM. Beffagna et al. (2005) beschrieben zwei Krankheit auslösende regulatorische Mutationen in der UTR-Region des „*transforming growth factor-beta3*“-*Gens* (*TGF β 3*), die in vitro zu einer erhöhten Expression des *TGF β 3*-*Gens* führen. Die erste nukleotidsubstituierende Mutation (c.-36G>A) konnte in einer ARVD1-Familie mit 38 Angehörigen identifiziert und in der 5'UTR des *TGF β 3*-*Gens* lokalisiert werden. Weitere Untersuchungen an 30 nicht miteinander verwandten ARVC-Patienten ergaben eine zusätzliche Mutation (c.1723C>T) in der 3'UTR eines Probanden. Das *TGF β 3*-*Gen* gehört zur Familie der Wachstumsfaktoren („transforming growth factor family“), die für regulierende Zytokine kodieren und eine wichtige Rolle in der Gewebsentwicklung und –homöostase spielen (Sporn et Roberts, 1992). Des Weiteren ist gesichert, dass TGF β -Proteine mesenchymale Zellen zur Proliferation und zur Produktion von extrazellulären Matrixkomponenten stimulieren und somit eine Fibrose in verschiedenen Geweben induzieren können (Leask et Abraham, 2004). Die durch die Mutationen erhöhte Expression des *TGF β 3*-*Gens* könnte in vivo eine myokardiale Fibrose auslösen und im Weiteren zu ventrikulären Arrhythmien prädisponieren.

Anhand einer aus der Schweiz stammenden Familie wurde von Rampazzo et al. (1995) ein zweiter ARVC-Locus (ARVD2) auf Chromosom 1q42-q43 mit autosomal-dominantem Erbgang identifiziert. Durch molekulargenetische Untersuchungen an zwei anderen Familien konnte der ARVD2-Locus mit signifikant positiven Lod-Scores für den α -Actinin-2-Marker und zwei weiteren das *ACTN2*-*Gen* flankierenden Markern bestätigt werden (Bauce et al., 2000). Die ARVD2 ist durch anstrengungsabhängige

polymorphe ventrikuläre Arrhythmien, einer hohen Krankheitspenetranz von 95% und ein hohes Risiko, am plötzlichen Herztod zu sterben, charakterisiert. Frauen und Männer sind im Gegensatz zu anderen Formen der ARVC im gleichen Verhältnis betroffen. Typische EKG-Veränderungen konnten bei keinem der Patienten nachgewiesen werden.

Tiso et al. (2001) konnten in vier unabhängigen Familien vier unterschiedliche ARVD2-Mutationen im kardialen *Ryanodinrezeptor-Gen* (*RYR2*) nachweisen (R176Q, L433P, N2386I und T2504M). Der Ryanodinrezeptor führt zur Kalziumfreisetzung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum und spielt eine wesentliche Rolle bei der Regulation der intrazellulären Kalziumhomöostase und dem Zusammenspiel von Exzitation und Kontraktion der Herzmuskelzelle. Klinisch können sich Störungen seiner Funktion in Zelluntergang und Herzrhythmusstörungen manifestieren. Die vier „Missense“-Mutationen im *Ryr2-Gen* sind in zwei hochkonservierten Regionen lokalisiert, welche zu ähnlichen Regionen des *Ryr1-Gens* korrespondieren und für zytoplasmatische Domänen des Kalziumkanals kodieren. Mutationen im *Ryr1-Gen* führen zu einer erhöhten Kalziumfreisetzung aus dem SR (Yamamoto et al., 2000), was vermuten lässt, dass *Ryr2*-Mutationen einen ähnlichen Effekt besitzen und dadurch die anstrengungsabhängigen Arrhythmien bei ARVD2 verursachen könnten.

Severini et al. (1996) untersuchten drei Familien mit autosomal-dominanter ARVC und konnten eine Kopplung auf den langen Arm von Chromosom 14 (14q12-q22) feststellen (ARVD3, maximaler kumulativer 2-Punkt-Lod-Score für den Marker D14S252 von 3.26). Das Krankheitsintervall, das ca. 30 cM von dem ARVD1-Locus getrennt ist, wurde auf 15 cM zwischen den Markern D14S262 und D14S69 (maximaler Multipoint-Lod-Score von 4.7) definiert. Bedingt durch das niedrige Signifikanzniveau des kumulativen Lod-Scores bedarf es einer weiteren Konfirmierung dieses Locus. Es scheint fraglich, ob die Erkrankung in beiden Patientenkollektiven (ARVD1 und ARVD3) nicht auf einem gemeinsamen Locus beruht. Aufgrund der unterschiedlichen Nationalität der drei Familien kann davon ausgegangen werden, dass der ARVD3 kein Founder-Effekt zugrunde liegt.

Der vierte autosomal-dominante ARVC-Locus wurde von Rampazzo et al. (1997) auf dem langen Arm von Chromosom 2 kartiert (ARVD4, 2q32.1-q32.3) und umfasst eine 5 cM große Region. Die drei untersuchten Familien zeigten eine ARVC mit zusätzlicher segmentaler Beteiligung des linken Ventrikels und einen positiven kumulativen Lod-Score von 3.46. Das für die Mutation verantwortliche Gen konnte noch nicht identifiziert

werden. Aufgrund des niedrigen Signifikanzniveaus des kumulativen Lod-Scores in dieser Studie kann nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden, dass die Hinweise auf Kopplung auf Chromosom 2 zufällig sind.

1998 wurde der fünfte Locus für autosomal-dominante ARVC von Ahmad et al. beschrieben (ARVD5). Anhand der Untersuchung einer ca. 200 Mitglieder umfassenden nordamerikanischen Familie wurde eine 9.3 cM umspannende Region auf Chromosom 3p23 mit einem Lod-Score von 6.91 für den Marker D3S3613 beschrieben. Charakteristischerweise konnte eine inkomplette Penetranz der Erkrankung von 67% und eine durchschnittliche Diagnosestellung um das 43. Lebensjahr festgestellt werden. Eine Kopplung für familiäre dilatative Kardiomyopathie wurde bereits für diesen Locus identifiziert (Olson und Keating, 1996), was vermuten lässt, dass möglicherweise unterschiedliche Defekte eines Gens diese beiden Erkrankungen hervorrufen könnten. Merner et al. (2008) konnten durch feinere Kartierung und Haplotypanalysen an 15 nicht verwandten kanadischen Familien die Region auf 2,36 Mb auf Chromosom 3p25 spezifizieren. Die zugrunde liegende Mutation für ARVD5 wurde durch Merner und Kollegen (2008) im *TMEM43-Gen* in Form einer „Missense“-Mutation (1073C→T, S358L) identifiziert und ist in einer hochkonservierten transmembranären Domäne lokalisiert. Derzeit ist über die Funktion des *TMEM43-Gens* wenig bekannt. Dennoch vermutet man eine Interaktion zwischen PPAR γ (adipogener Transkriptionsfaktor) und TMEM43 (Lemay et Hwang, 2006), welche den fibrös-fettigen Ersatz des Myokardiums erklären könnte.

Eine weitere autosomal-dominant vererbte Form der ARVC mit ungewöhnlich frühem Beginn und hoher Penetranz der Erkrankung wurde von Li et al. (2000) auf Chromosom 10p12-p14 kartiert (ARVD6). In der untersuchten nordamerikanischen Familie wiesen alle Kinder mit positivem Haplotyp bereits vor dem 10. Lebensjahr pathologische oder klinische Manifestationen der ARVC auf. Im Erwachsenenalter wurde eine hohe Inzidenz des plötzlichen Herztodes beobachtet. Der maximale kumulative 2-Punkt-Lod-Score betrug für den Marker D10S1664 3.92. Anhand einer Genotypisierung und Haplotypanalyse konnte eine Krankheitsregion von 10.6 cM zwischen den Markern D10S547 und D10S1653 auf dem kurzen Arm von Chromosom 10 identifiziert werden. Als mögliches Kandidatengen wurde das für ein zytoskelettales Protein kodierende Vimentin vorgeschlagen. Die Krankheitsregion konnte später durch Genkopplungs- und Haplotypanalysen einer südafrikanischen Familie auf ca. 2,9 Mb zwischen den Markern D10S1707 und D10S1477 reduziert werden (Matolweni et al., 2006).

Eine von Melberg et al. (1999) beschriebene Region in einer schwedischen Familie mit autosomal-dominantem Erbgang zeigte zwischen den Markern D10S605 und D10S215 auf Chromosom 10q22.3 einen kumulativen Multipoint-Lod-Score von 3.06 (ARVD7). Der maximale kumulative 2-Punkt-Lod-Score von 2.76 wurde für den Marker D10S1752 gefunden. Dieses Krankheitsintervall soll einen genetischen Defekt für myofibrilläre Myopathie in Kombination mit ARVC tragen. Die Krankheitsregion konnte durch Kuhl und Mitarbeiter (2008) zwischen den Markern D10S1645 and D10S1786 auf 4,27 Mb eingengt werden. Die durch Selcen und Engel (2005) identifizierten Mutationen im *ZASP-Gen* bei Patienten mit myofibrillärer Myopathie und kardialer Beteiligung konnten bei der schwedischen Familie nicht bestätigt werden, so dass das Krankheitsgen derzeit noch unbekannt ist.

1.4.2 Desmosomale ARVC-Krankheitsgene

Desmoplakin und Plakoglobin gehören zur Familie der desmosomalen Catherine, die an intermediäre Filamente binden und somit an interzellulären Kontakten vorwiegend epidermaler und kardialer Zellen beteiligt sind (Kowalczyk et al., 1997, Gallicano et al., 1998, Smith und Fuchs, 1998, Leung et al., 2002). Desmosome sind besonders für die Stabilität und den Zusammenhalt der Zellen verantwortlich. Mutationsbedingte Defekte der interzellulären Verbindungen scheinen entscheidend am Pathomechanismus der ARVC beteiligt zu sein.

Bei der genetischen Untersuchung einer italienischen Familie wurde von Rampazzo et al. (2002) eine Mutation im *Desmoplakin-Gen* auf Chromosom 6p24 gefunden, die für eine autosomal-dominante Form der ARVC verantwortlich ist (ARVD8). Der maximale kumulative 2-Punkt-Lod-Score von 4.32 wurde für den Marker D6S309 nachgewiesen. Die Penetranz der Erkrankung wurde auf ca. 50% geschätzt. Im Gegensatz zu der aus 240 Personen bestehenden Kontrollpopulation ergab die Sequenzierung des *Desmoplakin-Gens* in allen klinisch betroffenen Familienmitgliedern und in einigen Verwandten mit noch unklarem klinischen Status eine „Missense“-Mutation in Exon 7 (C1176G; AGC→AGG). Diese Mutation befindet sich in einer Region, die in Interaktionen mit anderen Proteinen des Desmosomenkomplexes involviert ist. Der Aminosäureaustausch (S299R) in Exon 7 führt zur Modifizierung einer Phosphorylierungsstelle in der N-terminalen Plakoglobin - bindenden Domäne. Norman et al. (2005) beschrieben eine weitere heterozygote Insertionsmutation (2034insA) im *Desmoplakin-Gen* mit autosomal-dominantem Erbgang, welche über eine Verschiebung

des Leserasters zu einem vorzeitigen Stoppkodon führt und bei den Betroffenen eine vorwiegend linksventrikuläre Kardiomyopathie verursacht.

Garcia-Gras und Kollegen (2006) konnten durch molekularbiologische Experimente zur Pathogenese der durch eine Mutation im *Desmoplakin-Gen* hervorgerufenen ARVC beitragen. Die kardiale Suppression des desmosomalen Proteins Desmoplakin führt zur Translokation von Plakoglobin in den Nukleus und damit zu einer Unterdrückung des kanonischen Wnt/ β -Catenin-Signalweges. Konsekutiv kommt es zu einer erhöhten Expression von fibro- und adipogenen Gene, welche zur verstärkten Adipozytenbildung beitragen. Eine herzspezifische Deletion des *Desmoplakin-Gens* führte zur schwerwiegenden Beeinträchtigung der kardialen Entwicklung und in homozygoter Form zu einer hohen embryonalen Letalität.

Im Folgenden konnten weitere Genmutationen in anderen Zytoskelettproteinen gefunden werden, die zu einer Desintegrität des Zellverbands und zu einer gestörten interzellulären Signaltransduktion führen. Möglicherweise kommt es unter mechanischer Dehnung des Myokards und katecholaminergem Stress zur Unterbrechung der Zellkontakte und zum progressiven Zelltod mit konsekutiv fibrös-fettigem Ersatz der Herzmuskulatur (Mallat et al., 1996), was bereits in einer In-vitro-Studie von Schnittler et al. (1997), unter mechanischem Stress der Zellen demonstriert werden konnte.

Basierend einerseits auf der Identifizierung verschiedener rezessiver Mutationen im *Plakophilin-1-Gen*, die zu einem ektodermalen dysplastischen Fragilitätssyndrom der Haut führen, und andererseits auf dem letalen Defekt in der kardialen Morphogenese in homozygoten Mäusen am Tag 10,75 der Embryogenese, die eine Deletion des *Plakophilin-2-Gens* aufwiesen (Grossmann et al., 2004), wurden in unserer Arbeitsgruppe von Gerull et al. (2004) molekulargenetische Untersuchungen im *Plakophilin-2-Gen* (*PKP2*) an 120 Patienten mit ARVC ohne Verwandtschaftsbeziehungen durchgeführt (ARVD9). Das *PKP2-Gen* befindet sich auf Chromosom 12p11 und kodiert für das desmosomale „armadillo-repeat“ Protein Plakophilin-2. Bei 32 der 120 Probanden wurden 25 unterschiedliche heterozygote Mutationen gefunden (12 Insertions-/Deletionsmutationen, 6 „Nonsense“-Mutationen, 4 „Missense“-Mutationen und 3 „Splice-site“-Mutationen). Weitere Punkt- bzw. Rastermutationen im *Plakophilin-2-Gen* wurden durch Syrris und Mitarbeiter (2006a) bzw. van Tintelen und Kollegen (2006) identifiziert.

Als desmosomales Protein wurde auch Desmoglein-2 (DSG-2) auf Mutationen untersucht (Pilichou et al., 2006). Das Mutationsscreening von 54 nicht verwandten

ARVC-Patienten führte zur Entdeckung von 9 heterozygoten Mutationen (5 „Missense“- , 2 Insertions-, bzw. Deletions-, 1 „Nonsense“- und 1 „Splice-site“-Mutationen) im *DSG-2-Gen* auf Chromosom 18q12.1-q12.2 (ARVD10). Syrris et al. (2007) fanden 8 zusätzliche Mutationen im *Desmoglein-2-Gen*.

Als weiteres, ARVC auslösendes Gen, wurde durch Heuser und Kollegen (2006) das desmosomale Catherin Desmocollin-2 (DSC2) auf Chromosom 18q12.1 entdeckt (ARVD11). Die Untersuchung an 88 nicht verwandten ARVC-Patienten ergab eine Mutation in Intron 5 (c.631-2A→G) von *DSC2*, welche zu einer kryptischen Spleiß-Akzeptorstelle und zu einem vorzeitigen Stoppkodon führt. Durch quantitative Analysen konnte eine deutlich reduzierte kardiale DSC2-Expression festgestellt werden. Knockdown-Experimente im Zebrafisch unterstrichen die Notwendigkeit von DSC2 für eine regelrechte Herzentwicklung. Syrris und Kollegen (2006b) beschrieben 2 weitere Mutationen im *DSC-2-Gen*.

Im *Plakoglobin-Gen* auf Chromosom 17q21 wurde eine Insertionsmutation von 3 Basen (118_119insGCA) bei einer Familie mit autosomal-dominantem Erbgang ohne dermatologische Manifestationen wie bei der Naxos-Krankheit (siehe unten) gefunden, die zu einem zusätzlichen Serinrest in der N-terminalen Domäne führt (ARVD12, Asimaki et al., 2007).

Coonar et al. (1998) führten eine klinische und genetische Untersuchung an Patienten mit der autosomal-rezessiv vererbten Naxos-Krankheit durch und konnten den genomischen Locus auf Chromosom 17q21 lokalisieren. Der höchste 2-Punkt-Lod-Score von 3.62 wurde mit einem Intronmarker des *Keratin9-Gens* nachgewiesen, das sich innerhalb einer Anhäufung verschiedener Keratingene befindet. Die Naxos-Krankheit wurde zuerst auf der gleichnamigen griechischen Insel beobachtet und ist durch die Trias palmoplantare Hyperkeratose, krauses Haar und ARVC charakterisiert (Protonotarios et al., 1986). Wie eine Studie von Protonotarios et al. (2001) zeigte, besteht für homozygote Individuen eine 100%ige Penetranz, in der Adoleszenz die diagnostischen kardialen Abnormalitäten zu erfüllen, wohingegen die kutanen und pilären Manifestationen bereits im frühen Kindesalter auftreten. Die krankheitsauslösende Mutation wurde durch McKoy et al. (2000) als eine homozygote Zwei-Basenpaar-Deletion in der C-terminalen Region des *Plakoglobin-Gens* (Pk2157del2) beschrieben, welche zum Verschieben des Leserasters und damit zum frühzeitigen Abbruch der Translation von Plakoglobin führt.

Plakoglobin ist ein Zelladhäsionsprotein, welches eine tragende Rolle bei der Formierung von Desmosomen und der Erhaltung der Zellintegrität spielt. In einem Plakoglobin-Deletionsmodell der Maus (Ruiz et al., 1996) wurde bei Tieren, welche homozygot für die Plakoglobin-Deletion waren, embryonale Letalität zwischen dem 12. und 16. Tag der embryonalen Entwicklung gesehen. Die Ursache der Letalität liegt in der Ruptur des rechten Ventrikels.

Eine der Naxos-Erkrankung ähnliche Krankheitsentität wird durch eine autosomal-rezessive Mutation in der C-terminalen Domäne des *Desmoplakin-Gens* (7901delG) ausgelöst, welche für die Interaktion zwischen Desmoplakin und den intermediären Filamenten verantwortlich ist (Norgett et al., 2000). Diese Krankheitsvariante wird als Carvajal-Syndrom bezeichnet und führt zu einer dilatativen linksventrikulären Kardiomyopathie mit palmoplantarer Hyperkeratose und krausem Haar. Das Carvajal-Syndrom unterscheidet sich von der Naxos-Erkrankung einerseits durch die dominierend linksventrikuläre Beteiligung, andererseits durch die Fibrosierung des Herzens ohne fettigen Zellersatz (Carvajal-Huerta, 1998, Kaplan et al., 2004, Protonotarios et Tsatsopoulou, 2004).

Eine weitere genetische Untersuchung an einer arabischen Familie mit diesem kardiokutanen Phänotyp führte zur Identifizierung einer anderen autosomal-rezessiven Mutation (Gly2375Arg) in der C-terminalen Region des *Desmoplakin-Gens* (Alcalai et al., 2003).

Schließlich fanden Simpson und Kollegen (2009) eine homozygote Deletionsmutation im Exon 12 (1841delG) des *Desmocollin-2-Gens* auf Chromosom 18q12.1 heraus, welche für eine autosomal-rezessive Form der ARVC mit linksventrikulärer Beteiligung, milder palmoplantarer Hyperkeratose und krausem Haar verantwortlich ist. Diese Mutation führt zu einem vorzeitigen Stoppkodon auf Position 625 (S614fsX625).

Aufgrund der bereits aufgeführten Mutationen in den *Plakophilin-2*-, *Plakoglobin*-, *Desmocollin-2*-, *Desmoglein-2*- und *Desmoplakin-Genen* könnte die ARVC als Erkrankung des Desmosoms postuliert werden. In einer Untersuchung an 80 nicht verwandten ARVC-Probanden wurden in 40% der Fälle Mutationen in desmosomalen Genen nachgewiesen (Pilichou et al., 2006).

Die folgende Tabelle (1.3) gibt einen zusammenfassenden Überblick über die bekannten genomischen Loci/Krankheitsgene für ARVC.

Entität	Genomischer Locus	OMIM-Nr.	Krankheitsgen	Vererbung
ARVD1	14q23-q24	#107970	<i>TGFβ3</i>	a.-d.
ARVD2	1q42-q43	#600996	<i>RYR2</i>	a.-d.
ARVD3	14q12-q22	%602086	unbekannt	a.-d.
ARVD4	2q32.1-q32.3	%602087	unbekannt	a.-d.
ARVD5	3p25	#604400	<i>TMEM43</i>	a.-d.
ARVD6	10p12-p14	%604401	unbekannt	a.-d.
ARVD7	10q22.3	%609160	unbekannt	a.-d.
ARVD8	6p24	#607450	<i>DSP</i>	a.-d.
ARVD9	12p11	#609040	<i>PKP2</i>	-
ARVD10	18q12.1-q12.2	#610193	<i>DSG-2</i>	-
ARVD11	18q12.1	#610476	<i>DSC2</i>	-
ARVD12	17q21	#611528	<i>JUP</i>	a.-d.
Naxos	17q21	#601214	<i>JUP</i>	a.-r.
-	18q12.1	-	<i>DSC2</i>	a.-r.

Tab. 1.3: Genomische Loci für ARVD. Falls bekannt, sind zu jedem Locus der Vererbungsmodus, die OMIM-Nr. (Nr. des Eintrags in der OMIM-Datenbank) und das mutierte Krankheitsgen angegeben. Abkürzungen: *TGFβ3* (transforming growth factor, β-3), *RYR2* (ryanodine receptor 2), *TMEM43* (transmembrane protein 43), *DSP* (Desmoplakin), *PKP2* (Plakophilin-2), *DSG-2* (Desmoglein-2), *DSC2* (Desmocollin-2), *JUP* (junction plakoglobin), a.-d. (autosomal-dominant), a.-r. (autosomal-rezessiv).

1.5 Vorarbeiten zur vorliegenden Arbeit

1.5.1 Phänotypisierung und molekulargenetische Charakterisierung von 15 kanadischen ARVC-Familien

Im Labor der AG Prof. Thierfelder wurde der Phänotyp und das Krankheitsgen für an Chromosom 3p25 gekoppelte ARVC untersucht. In Zusammenarbeit mit kanadischen Kollaborationspartnern konnte nach Rekrutierung sowie klinischer und genetischer Charakterisierung von 15 Familien aus Neufundland, Kanada, eine neue Variante der ARVC mit autosomal-dominantem Erbgang und hoher Inzidenz des plötzlichen Herztodes identifiziert werden (ARVD5). Diese große, homogene und genetisch isolierte Population stellte eine ideale Kohorte dar, um Genotyp-Phänotyp-Untersuchungen durchzuführen (Abb. 1.1). Der ARVD5-Locus wurde initial durch Ahmad und Mitarbeiter (1998) auf Chromosom 3p an einer 8 Generationen umfassenden Familie (AR1) beschrieben und innerhalb einer 9,3 cM großen Region zwischen den STR-Markern D3S3610 und D3S3659 definiert. Parallel wurden 14 weitere Familien aus Neufundland mit dem ARVD5-Haplotyp identifiziert und in die Genotyp-Phänotyp-Untersuchungen aufgenommen. Die krankheitsspezifische Region konnte durch Merner und Kollegen (2008) auf 2,36 Mb eingengt werden.

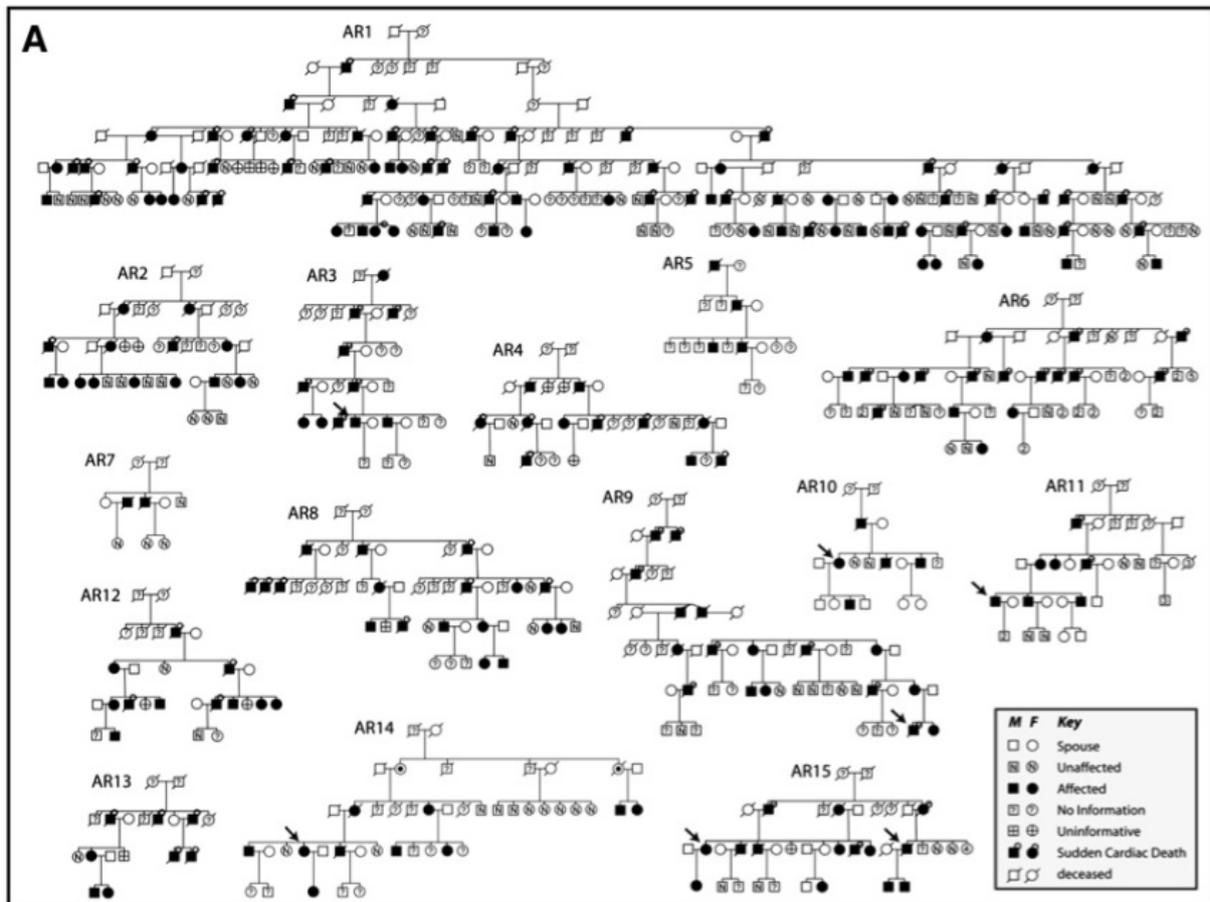


Abb. 1.1: Stammbaumstruktur der 15 ARVC-Familien aus Neufundland nach Merner et al., 2008

Die prospektive Erhebung der klinischen Befunde erfolgte über 11 Jahre und umfasste die jährliche Durchführung von 12-Kanal-EKG, Holter-EKG, Echokardiographie und Signalmittelungs-EKG. Die klinische Diagnose der ARVC wurde anhand der modifizierten McKenna-Kriterien gestellt (Hamid et al., 2002). Der krankheitsassoziierte Phänotyp konnte bei ca. 300 von 496 Individuen evaluiert werden. Die Familienmitglieder wurden nach folgenden Kriterien der Hochrisikogruppe, Mutationsträger zu sein, zugeordnet: plötzlicher Herztod vor Erreichen des 50. Lebensjahrs, Nachweis des Hochrisiko-Haplotyps durch DNA-Analyse und Vererbung der Mutation auf die Nachkommen.

Klinisch kommt es anfangs zu einer rechtsventrikulären Kardiomyopathie, die hauptsächlich bei Männern im jungen Alter zum plötzlichen Herztod führen kann. 86% der Männer und 42% der Frauen, die während des Untersuchungszeitraumes gestorben waren, erlitten einen plötzlichen Herztod. Durch statistische Analysen konnte eine deutlich schlechtere Prognose für Männer im Gegensatz zu Frauen mit ARVD5 evaluiert werden (mittlere Lebenserwartung bei Männern 41 Jahre, bei Frauen 71

Jahre). Interessanterweise zeigten ca. 30% der kanadischen ARVC-Patienten außerdem eine altersabhängige linksventrikuläre Beteiligung in Form einer Vergrößerung (definiert als LVEDD > 112%) und/oder Pumpfunktionseinschränkung des linken Ventrikels. Bereits in mehreren anderen Studien wurde eine linksventrikuläre Beteiligung bei der ARVC postuliert (Lobo et al., 1999, Lindstrom et al., 2005, Matsuo et al., 2007, Pinamonti et al., 1998 und Norman et al., 2005). Beide Geschlechter der kanadischen ARVC-Patienten, die nicht an einem plötzlichen Herztod gestorben waren, entwickelten eine Herzinsuffizienz als späte Manifestation der Erkrankung.

Das 12-Kanal-EKG der kanadischen Patienten zeigt eine fehlende R-Progression in den präkordialen Ableitungen mit einer altersabhängigen linearen Steigerung in der Inzidenz (Abb. 1.2). Dieses EKG-Muster, welches üblicherweise bei Vorderwandinfarkten gesehen werden kann, ist bei der ARVC vor kurzem beschrieben worden (Steriotis et al., 2009) und nicht mit einer koronaren Herzkrankheit assoziiert.

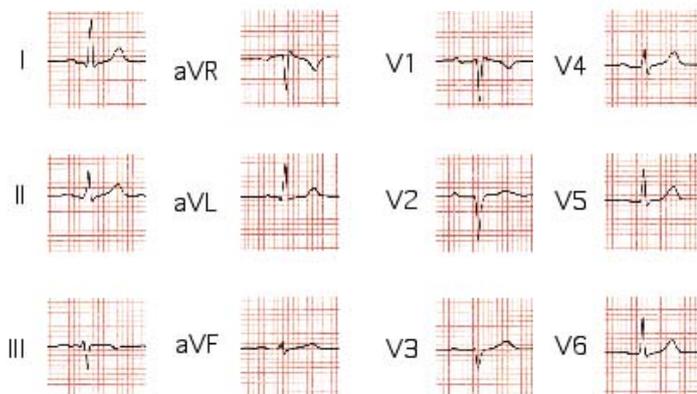


Abb. 1.2: 12-Kanal-EKG eines Patienten mit ARVC5. Fehlende R-Progression über der Vorderwand.

Zusätzlich konnte in 30% der betroffenen Männer eine QRS-Verbreiterung im EKG gefunden werden, die wesentlich seltener bei betroffenen Frauen oder gesunden Familienmitgliedern auftrat. Weitere ARVC typische EKG-Veränderungen wie rechtspräkordiale T-Negativierungen oder Epsilon-Wellen konnten in weniger als 3% der kanadischen Patienten festgestellt werden. Eine Neigung zur Ektopie wurde bei den ARVC-Patienten im Vergleich zu deren gesunden Angehörigen mittels Holter-EKG gesichert.

Um die Penetranz der ARVD5 beurteilen zu können, wurden die erhobenen klinischen Daten von insgesamt 137 Betroffenen (60 Männer und 77 Frauen) untersucht. Das mittlere Alter, einen ARVD5-assoziierten Phänotyp zu entwickeln, betrug bei Männern

32 Jahre (95%-Konfidenzintervall 28-35 Jahre) und bei Frauen 44 Jahre (95%-Konfidenzintervall 39-48 Jahre). Eine 100%ige Penetranz der Erkrankung konnte im Alter von 63 Jahren bei Männern versus 76 Jahren bei Frauen evaluiert werden. Anhand dieser Ergebnisse wurde die ARVD5 als letale und geschlechtsspezifische Erkrankung mit vollständiger Penetranz und autosomal-dominantem Erbgang definiert (Merner et al., 2008). Genetische Kopplungsanalysen an Angehörigen der Familie AR1 mit mehreren polymorphen CA-Repeat (STR-) Markern von Chromosom 3p25 zeigten hochsignifikant positive 2-point- und Multipoint-LOD-Scores (Daten nicht gezeigt).

Betroffene Personen des ARVC-Stammbaumes AR1 und der 14 zusätzlichen Familien (AR2-15) weisen einen identischen Hochrisiko-Haplotyp auf Chromosom 3p25 auf. Dies lässt darauf schließen, dass auch die ursächliche krankheitsauslösende Mutante in den sieben Familien identisch ist und als Foundermutation mit lokal hoher Prävalenz aufgrund der geringen Wanderungstendenz der dortigen Bevölkerung bezeichnet werden kann.

Zusätzlich konnte der genetische Locus in unserer Arbeitsgruppe durch den Nachweis genetischer Rekombinationsereignisse in allen Familien auf unter 2 cM eingengt werden. Als die den ARVC-Locus flankierenden STR-Marker („short tandem repeat“-Marker) wurden D3S3610 und REN49088 identifiziert. Die das Krankheitsgen enthaltende Region umfasst eine ca. 2 Megabasen lange DNA-Sequenz, welche, entsprechend Bioinformatikanalysen, 14 verschiedene Gene enthält (Abb. 1.3). Im Gegensatz dazu wählten Merner und Kollegen (2008) D3S3610 und D3S3613 als flankierende Marker und untersuchten eine größere Region von 2,36 Mb mit insgesamt 20 Genen.



Abb. 1.3: Genetische Karte der kritischen ARVD5-Region (Stand 10/03). Die Pfeile zeigen die Transkriptionsrichtung der einzelnen Gene an.

1.6 Zielstellung der Arbeit und eigene molekulargenetische Untersuchungen

Im Rahmen dieser Arbeit wurde nach der ARVD5 verursachenden Mutation gesucht. Ein Mitglied der ARVC-Familie AR2 erlag im Sommer 2002 einem plötzlichen Herztod. Im Rahmen der gerichtsmedizinischen Obduktion wurde ein Teil des erkrankten Herzens asserviert. Dieses Gewebe wurde der AG Thierfelder für weiterführende Untersuchungen zum Nachweis der Mutante zur Verfügung gestellt. Zusätzlich wurde lymphozytäre DNA von Betroffenen und Kontrollpersonen für die Untersuchungen verwendet. Damit wurden RT-PCR-Analysen von allen der 14 potentiellen Krankheitsgene des Chromosom-3p25-Locus durchgeführt. Neben der kodierenden Sequenzen (Exons) der 14 Kandidatengene wurde ein besonderes Augenmerk auf die Promotor-, 3'UTR-Bereiche und flankierenden Intronsequenzen gelegt. Die Amplifikation der Exons erfolgte sowohl an genomischer DNA als auch an komplementärer DNA (cDNA).

In Abhängigkeit der Ergebnisse aus der Sequenzierung der RT-PCR-Produkte erfolgten weitere molekulargenetische Untersuchungen der Gene (Klonierungen, Southern Blots, Northern Blots, DHPLC, etc.). Andererseits wurden Gene, die anhand ihrer Funktion und Expression im Herzen als plausible Kandidatengene identifiziert werden konnten, mittels verschiedener molekularbiologischer Methoden genauer analysiert.

Tabelle 1.4 zeigt die physikalische Genkarte des Locus auf Chromosom 3p25 (NCBI Stand 10/03). Neben den gesicherten Genen konnten hypothetische Gene oder Sequenzen mit geringer Evidenz im Locus gefunden werden. Diese hypothetischen Gene werden durch biomathematische Modelle vorhergesagt und müssen häufig nachträglich aus der Datenbank zurückgezogen werden. Mit Ausnahme des vorhergesagten Gens LOC285375 wurden im Rahmen dieser Arbeit aufgrund der geringen Evidenz keine dieser durch Bioinformatikanalysen vorhergesagten Sequenzen untersucht.

Gene	Zugangsnr.	OMIM-Nr.	Strang	Genomische Position		Exons
				Start	Ende	
LOC339917	- *	-	-	-	-	Keine
LOC344871	- *	-	+	-	-	Keine
LOC348824	- *	-	-	-	-	Keine

Gene	Zugangsnr.	OMIM-Nr.	Strang	Genomische Position		Exons
				Start	Ende	
<i>NUP210</i>	NM_024923	607703	-	13436809	13332737	40
<i>HDAC11</i>	NM_024827	607226	+	13496824	13521834	10
<i>LOC339918</i>	- *	-	-	-	-	Keine
<i>FBLN2</i>	NM_001004019	135821	+	13565625	13654922	18
<i>LOC285374</i>	AK022363 *	-	+	-	-	Keine
<i>LOC285375</i>	NR_027103.1	-	+	13692221	13788132	6
<i>LOC344872</i>	- *	-	-	-	-	Keine
<i>WNT7A</i>	NM_004625	601570	-	13896619	13835083	4
<i>LOC285376</i>	AK056482 *	-	+	-	-	Keine
<i>TPRXL</i>	AK092426	611167	+	13953902	14082480	3
<i>LOC255713</i>	- *	-	-	-	-	Keine
<i>CHCHD4</i>	NM_144636	611077	-	14141323	14128584	4
<i>TMEM43</i>	NM_024334	612048	+	14141546	14160180	12
<i>XPC</i>	NM_004628	278720	-	14195143	14161651	16
<i>LSM3</i>	NM_014463	607283	+	14195341	14214840	4
<i>LOC285378</i>	-	-	+	-	-	Keine
<i>LOC351546</i>	- *	-	+	-	-	Keine
<i>LOC344873</i>	- *	-	-	-	-	Keine
<i>SLC6A6</i>	NM_003043	186854	+	14419110	14503973	15
<i>LOC220753</i>	- *	-	+	-	-	Keine
<i>GRIP2</i>	NM_001080423	-	-	14558592	14510177	25
<i>LOC131973</i>	-	-	-	14617361	14614293	Keine
<i>LOC351547</i>	- *	-	+	-	-	Keine
<i>C3orf19</i>	NM_016474	-	+	14668278	14689167	11
<i>C3orf20</i>	NM_032137	-	+	14691658	14789544	17

Tab. 1.4: Physikalische Genkarte des ARVD5-Locus auf Chromosom 3p25.

Neben den 13 Genen wurde im Rahmen dieser Arbeit das vorhergesagte Gen *LOC285375* untersucht. Alle weiteren hypothetischen Gene (LOC) wurden aufgrund der geringen Evidenz nicht analysiert. In der Tabelle sind die Accession-Nr. (Zugangsnummer zur Sequenz in der Datenbank NCBI), OMIM-Nr. (Zugangsnummer zu den Einträgen in der Datenbank „Online Mendelian Inheritance in Man“ OMIM), Transkriptionsrichtung, Beginn und Ende des Gens auf dem genomischen Klon NC_000003.11 und die Anzahl der Exons angegeben. Mit * sind die vorhergesagten Gene markiert, welche im Nachhinein aus der Datenbank herausgenommen wurden.

II. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Standardpuffer und Lösungen

1 x TBE-Puffer:	90 mM Borsäure; 90 mM Tris-Base; 20 mM EDTA pH 8,0
1 x TAE-Puffer:	40 mM Tris-Acetat; 1 mM EDTA pH 8,3
TE-Puffer:	1 mM EDTA; 10 mM Tris/HCl pH 8,0
20 x SSC (pH 7,0):	3 M NaCl; 300 mM Tri-Natriumcitrat
Denaturierungslösung:	1,5 M NaCl; 500 mM NaOH
Neutralisierungslösung:	1,5 M NaCl; 500 mM Tris/HCl pH 7,0
STE-Puffer:	100 mM NaCl; 50 mM Tris/HCl pH 8,0; 100 mM EDTA
Agaroselösung für DNA-Gele:	0,5-2% (w/v) Agarose in 1 x TBE – oder in 1 x TAE - Puffer
Ladepuffer für DNA-Gele:	10 mM Tris/HCl pH 7,6; 0,03% (w/v) Bromphenolblau; 0,03% (w/v) Xylencyanol; 60% (v/v) Glycerin; 60 mM EDTA, Lagerung bei 4°C
Marker für DNA-Gele:	Gene Ruler 100 bp/ 1 kb von MBI Fermentas, Wilna, Litauen

2.1.2 Stammlösungen (nach Sambrook et al., 1989)

DEPC-H ₂ O:	Wasser wird mit 0,1% Diethylpyrocarbonat (v/v) über Nacht bei RT inkubiert und anschließend autoklaviert
Ampicillin:	100 mg/ml Ampicillin in H ₂ O, sterilfiltriert, Lagerung bei -20°C
Chloramphenicol:	50 mg/ml Chloramphenicol in H ₂ O, sterilfiltriert, Lagerung bei -20°C
Kanamycin:	50 mg/ml Kanamycin in H ₂ O, sterilfiltriert, Lagerung bei -20°C
X-Gal:	2% (w/v) X-Gal in Dimethylformamid, Lagerung bei -20°C
IPTG:	100 mM Isopropyl-β-D-Thiogalactosid in H ₂ O, Lagerung bei - 20°C
50 x Denhardt's Lösung:	1% (w/v) BSA; 1% (w/v) Ficoll 400; 1% (w/v) Polyvinylpyrrolidon, sterilfiltriert, Lagerung bei -20°C

2.1.3 Medien

LB-Medium:	0,5% (w/v) Hefeextrakt; 0,5 % (w/v) NaCl 1% (w/v) Trypton; autoklavieren, Lagerung bei 4°C
LB-Amp-Medium:	LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin
LB-Chloramp-Medium:	LB-Medium mit 50 µg/ml Chloramphenicol
LB-Kan-Medium:	LB-Medium mit 50 µg/ml Kanamycin
LB-Agar:	LB-Medium; 15 g/l Bacto-Agar

Alle aufgeführten Zusätze wurden dem Medium nach dem Autoklavieren und Abkühlen zugegeben. Bei der Herstellung von Platten wurde das Medium auf 50°C abgekühlt und nach der Zugabe sofort in sterile Petrischalen überführt.

2.1.4 Plasmidvektoren

Folgende Vektoren wurden für Klonierungen verwendet:

pBlueScript KS +/-	Stratagene, Heidelberg
pGEM-T easy	Promega, Heidelberg
pCRII-TOPO-Vektor	Invitrogen, Karlsruhe
pCR-XL-TOPO-Vektor	Invitrogen, Karlsruhe

2.1.5 Bakterienstämme

Folgende hitzekompetente Bakterienstämme wurden für Klonierungen verwendet:

DH5α-T1 und TOP10F für den pCRII-TOPO-Vektor

Mach1-T1 und OmniMAX 2-T1 für den pCR-XL-TOPO-Vektor

JM109 pGEMt

2.2 Methoden

2.2.1 Isolierung von Nukleinsäuren

2.2.1.1 Isolierung von humaner genomischer DNA aus Lymphozyten

Für die Durchführung von Southern-Blot-Analysen und für die PCR-Diagnostik im Hinblick auf eine Mutationssuche und Haplotypisierung wurde humane genomische DNA benötigt. Diese wurde aus menschlichen Lymphozyten nach dem QIAamp® DNA Blood Mini bzw. Midi Kit (Qiagen, Hilden) präpariert. Um die DNA aus den Zellen frei zu setzen und weiterverarbeiten zu können, wurde die Blutprobe (200 µl für den Mini- bzw. 2 ml für den Midi-Kit) für 10 min. bei 56°C mit einem SDS-haltigen Lysepuffer und Proteinase K inkubiert. Während Proteinase K die enthaltenen Proteine abbaut, führt SDS zur Lyse der Zellen. Nach Zugabe von 96%igem Ethanol und kurzer Zentrifugation

bei 6000xg wurde die DNA an silikathaltigem Trägermaterial (QIAamp Spinsäulen) gebunden und durch verschiedene Wasch- und Zentrifugationsschritte von anderen Zellbestandteilen und verbliebenen Kontaminanten gereinigt (6000xg bzw. 20000xg). Zur Elution der gereinigten DNA aus der Säule wurde je nach gewünschter Konzentration der Probe eine unterschiedliche Menge an H₂O bzw. TE-Puffer auf die Säule gegeben und zur Erhöhung der DNA-Ausbeute vor der Zentrifugation (6000xg) für 5 min. bei Raumtemperatur inkubiert.

2.2.1.2 Isolierung von Gesamt-RNA aus Herzgewebe

Die Isolierung der Gesamt-RNA aus Herzgewebe von Patienten bzw. Kontrollpersonen, welches bei -80°C gelagert wurde, erfolgte mit dem RNeasy mini Kit von Qiagen, Hilden. Das Herzgewebe (ca. 40-80mg) wurde nach Zugabe von β -Mercaptoethanol und eines Puffers, der Guanidinisothiocyanat (GTC) enthält, mit Hilfe eines Ultraturrax Homogenisators (IKA-Labortechnik) homogenisiert. GTC ist ein chaotropes Salz, welches effektiv Proteine inaktiviert und denaturiert. Die Zugabe von β -Mercaptoethanol dient der Inhibition von RNasen durch Denaturierung. Zum Abbau der Proteine erfolgte eine Inkubation der homogenisierten Lösung mit ddH₂O und Proteinase K für 10 min. bei 55°C. Nach Zugabe von 96%igem Ethanol wurde die Lösung auf silicathaltige Säulen zur Bindung von Nukleinsäuren gegeben und anschließend bei 8000xg zentrifugiert. Zur Verdauung der DNA wurde DNase I auf die Silicatmembran pipettiert und für 15 min. bei Raumtemperatur inkubiert. Die RNA wurde mehrmals gewaschen und mit 50 μ l RNase-freiem Wasser eluiert.

2.2.1.3 DNA- bzw. RNA-Konzentrationsbestimmung

Die endgültige Konzentration der isolierten DNA bzw. RNA wurde in einer Quarzküvette mittels eines UV-Photospektrometers bestimmt, indem eine 1:10-Verdünnung der jeweiligen Nukleinsäurelösung in Aqua dest. hergestellt und die Absorption bei 260 nm (A_{260}) gemessen wurde.

DNA und RNA absorbieren hauptsächlich bei einer Wellenlänge von 260 nm, während das Absorptionsmaximum von Proteinen bei 280 nm liegt. Aus dem Verhältnis der Absorption bei 260 nm (DNA- bzw. RNA-Absorptionsmaximum) und 280 nm (Proteinabsorptionsmaximum) konnte zusätzlich die Kontamination mit Proteinen und Salzen festgestellt werden. Der Quotient OD_{260}/OD_{280} (optische Dichte bei 260 und 280 nm) sollte optimalerweise zwischen 1,8-2,0 liegen. Größere Werte weisen auf Salzverunreinigungen, kleinere auf Proteinkontaminationen hin.

2.2.1.4 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die Isolierung von DNA-Fragmenten (PCR-Produkte, Plasmid-DNA, Restriktionsfragmente) nach der Auftrennung in einem Agarosegel erfolgte mit dem QIAquick Gel Extraction Kit der Firma Qiagen, Hilden. Diese Banden sollten anschließend entweder einer Sequenzierung (siehe 2.2.6), einer Klonierung (siehe 2.2.5) oder einer Hybridisierung (siehe 2.2.10.1) als DNA-Sonden zugeführt werden.

Die zu isolierende Bande wurde zunächst mit einem sterilen Skalpell unter kurzer UV-Exposition, um Depurinierungen, die Bildung von Basendimeren und Strangbrüche zu vermeiden, aus dem Gel ausgeschnitten und in ein Reaktionsgefäß überführt. Nach Auflösung der Agarose in einem Solubilisierungspuffer bei 50°C wurde die DNA an die im Puffer enthaltenen Glasmilchpartikel gebunden, welche als Silikate in der Gegenwart hoher Konzentrationen chaotroper Salze spezifisch DNA binden. Folgend wurden diese Partikel mit einem Ethanol und Salz enthaltenden Puffer gewaschen, die DNA wieder von den Partikeln eluiert und in 50 µl H₂O bzw. TE-Puffer aufgenommen.

2.2.1.5 Isolierung von Plasmid-DNA (Minipräparation)

Zur Isolierung von rekombinanten Plasmiden wurde zunächst nur eine kleine Menge an Plasmid-DNA präpariert. 5 ml LB-Medium, dem das entsprechende Antibiotikum zugesetzt wurde (Ampicillin bzw. Kanamycin), beimpfte man mit einer einzelnen Bakterienkolonie und inkubierte schüttelnd bei 37°C über Nacht. Die Präparation der Plasmid-DNA erfolgte mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit der Firma Qiagen, Hilden (Minipräparation), bei der jeweils 2 ml aus der Übernachtskultur eingesetzt wurden. Das Prinzip der Methode basiert darauf, dass nach Zentrifugation und Resuspension der Bakterienpellets eine Lyse der Zellen und eine Ausfällung der Zelltrümmer und Proteine einschließlich der daran gebundenen genomischen DNA erfolgt, die anschließend abzentrifugiert werden. Die Plasmid-DNA bleibt in Lösung und wird aus dem Überstand mit Hilfe einer Zentrifugationssäule unter Durchführung zweier Waschschriffe aufgereinigt und mit 50 µl H₂O aus der Säule eluiert (siehe 2.2.1.1).

Um die Klonierung eines Reamplifikates in den Vektor zu überprüfen, wurde eine Kontrollspaltung mit einer Restriktionsendonuklease durchgeführt. Beispielsweise flankieren im pCRII-TOPO-Vektor zwei EcoRI-Restriktionsstellen in der multiplen Klonierungsstelle das inserierte PCR-Produkt, so dass ein Fragment in der Größe des Vektors und ein Fragment in der Größe des ligierten DNA-Abschnitts entstehen. Der folgende Ansatz wurde zwecks Restriktion für 2 Std. bei 37°C inkubiert:

4 µl	Plasmid-DNA (ca. 1 µg)
2 µl	EcoRI - 10x Reaktionspuffer
1 µl	<i>EcoRI</i> (10 U/µl)
auf 20 µl mit H ₂ O	

Die Spaltprodukte wurden in einem 1,5%igen Agarose-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und mit Hilfe eines Transilluminators photographisch dokumentiert. Plasmide mit integrierter Insert-DNA wurden anschließend mit zwei vektorspezifischen Primern (M13 Reverse- und M13 (-20) Forward Primer bzw. T7 und T3) sequenziert.

2.2.1.6 Isolierung von Plasmiden im großen Maßstab (Midipräparation)

Eine Midipräparation wurde zur Isolierung von größeren Mengen reiner Plasmid-DNA durchgeführt (beispielsweise zur Gewinnung von DNA-Sonden für Southern Blots). Abgesehen vom Maßstab der Isolierung unterscheidet sich das Prinzip der Midipräparation kaum von dem der Minipräparation.

30 ml LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum wurden entweder mit einer einzelnen Bakterienkolonie oder mit 100 µl Bakterienkultur beimpft und über Nacht bei 37°C geschüttelt. Für die Plasmidisolierung wurde das Qiagen Plasmid Midi Kit von Qiagen, Hilden, benutzt. Bei diesem Verfahren werden die Bakterien alkalisch lysiert (modifizierte Methode nach Birnboim und Doly, 1979), anschließend wird die Plasmid-DNA in einigen Zentrifugationsschritten von RNA, Proteinen und anderen niedermolekularen Verunreinigungen gereinigt und an eine Anionenaustauschersäule gebunden gewaschen. Die Eluation erfolgt mit einem Hochsalzpuffer, die Entsalzung und Konzentrierung der Probe durch Isopropanolfällung. Das luftgetrocknete Pellet wurde in 300-500 µl H₂O aufgenommen, und die DNA-Konzentration photometrisch bestimmt. Um die Effizienz der Präparation zu beurteilen, wurde ähnlich der Minipräparation eine Testrestriktion der Plasmid-DNA mit anschließender Auftrennung mittels Gelelektrophorese vorgenommen (siehe 2.2.1.5). Zur Isolierung der Insert-DNA (zum Beispiel als Sonde für Hybridisierungen) wurde die Plasmid-DNA im großen Maßstab restringiert:

30 µl	Vektor-DNA (ca. 6 µg)
6 µl	EcoRI – 10 x Reaktionspuffer
2 µl	<i>EcoRI</i> (10 U/µl)
auf 60 µl mit H ₂ O	

Die Insertbande wurde in der Gelelektrophorese von der Plasmid-DNA aufgetrennt, aus dem Gel isoliert (siehe 2.2.1.4) und nach Konzentrationsmessung als Sonde für die Hybridisierung von Southern und Northern Blots bereitgestellt. Um bei erneutem Bedarf der Sonde nicht wiederholt klonieren, transformieren und isolieren zu müssen, wurde ein Bakterienstock aus 800 µl sterilem Glycerin und 200 µl Midi-Übernachtskultur hergestellt und bei – 80°C aufbewahrt.

2.2.2 Fällung von Nukleinsäuren

Eine Fällung von Nukleinsäuren wurde einerseits zum Aufreinigen von DNA durchgeführt, andererseits dann vorgenommen, wenn nach Präparation von DNA bzw. RNA oder nach Isolierung von DNA-Fragmenten aus dem Agarosegel die Konzentration zu niedrig war, um weitere Analysen vornehmen zu können. Bei der Alkoholfällung wurde zunächst zu jeder Probe 100%iges Ethanol in dreifacher Menge des Ausgangsvolumens und Natriumacetat (1/10 des Ausgangsvolumens, 3 M, pH 4,8-5,2) zugegeben. Die anschließende Zentrifugation über 25 min. bei 20000xg erfolgte unter Verwendung von DNA-Proben bei Raumtemperatur und unter Verwendung von RNA-Proben bei 4°C. Der Überstand wurde anschließend verworfen und die sich im Pellet befindende Nukleinsäure in 70%igem Ethanol (zweifache Menge des Ausgangsvolumens) gewaschen, entsalzen und erneut 25 min. bei Raumtemperatur bzw. bei 4°C zentrifugiert. Zwecks Ethanolverdunstung wurde das Pellet für 15 min. luftgetrocknet bzw. alternativ für 5 min. in einer SpeedVac-Zentrifuge, Savant, USA, unter Anlegen eines Vakuums zentrifugiert und in TE-Puffer bzw. RNase-freiem Wasser aufgenommen.

2.2.3 PCR (Polymerase-Kettenreaktion)

Mit der Polymerase-Kettenreaktion können spezifische Sequenzen aus geringsten DNA-Mengen effektiv amplifiziert werden. Das Prinzip beruht auf der enzymatisch-exponentiellen Vermehrung eines DNA-Fragmentes, welches zwischen zwei jeweils am komplementären Strang bindenden Oligonucleotidprimern liegt. Die Primer dienen damit als Startpunkt für die DNA-Synthese mittels der thermostabilen DNA-Polymerase. Durch sich wiederholende Zyklen von Denaturierung, Anlagerung der Primer (Annealing) und anschließender DNA-Synthese (Elongation) wird das zwischen den Startern liegende Fragment millionenfach amplifiziert.

Die in dieser Arbeit durchgeführten PCR-Experimente wurden in einem PTC-200 Thermocycler der Firma MJ Research, Waltham, USA durchgeführt. Auf das Überschichten des PCR-Ansatzes mit Mineralöl zur Vermeidung von Verdunstungsverlusten konnte bei Verwendung dieses Thermocyclers mit beheizbarem Deckel verzichtet werden.

2.2.3.1 PCR an humaner genomischer DNA

Die aus Lymphozyten isolierte genomische DNA (siehe 2.2.1.1) wurde einer PCR zugeführt, um nachfolgend durch Sequenzanalysen mögliche Mutationen und Polymorphismen entdecken zu können. Parallel wurde Kontroll-DNA amplifiziert, um Unterschiede in der Sequenz deutlicher erkennen und die Bedeutung der gefundenen Veränderungen (Mutation oder Polymorphismus) beurteilen zu können.

Für die Durchführung der PCR an humaner genomischer DNA wurde die Taq-DNA-Polymerase von Qiagen, Hilden, oder die Combi Pol-Polymerase von Invitex, Berlin, verwendet:

2 µl	humane genomische DNA (ca. 50-100 ng)
4 µl	Taq 10 x Puffer mit MgCl ₂
3,2 µl	dNTP-Mix (2,5 mM)
je 1,5 µl	Primer (10 pmol/µl)
0,14 µl	<i>Taq-DNA-Polymerase</i> (5 U/µl)
auf 40 µl mit H ₂ O	

Nach einer Denaturierung der DNA bei 96°C für 3 min. wurden folgende Temperaturen für 35 Zyklen durchlaufen:

Denaturierung:	96°C	15 sec.
Anlagerung („Annealing“):	54-65°C	1 min.
Elongation:	72°C	1 min.

Die Annealingtemperatur richtete sich nach dem Schmelzpunkt der jeweils verwendeten Primer, der von der Länge und Sequenz der Primer abhängt. Die Elongation wurde in Abhängigkeit von der Länge der jeweiligen PCR-Produkte unterschiedlich lang durchgeführt. Um die Synthese angefangener PCR-Produkte zu vervollständigen, erfolgte nach den 35 Zyklen ein Elongationsschritt für 7 min. bei 72°C.

Alternativ wurde für PCR-Produkte über 5 kb eine Long-Range-PCR mit TaKaRa La Taq-DNA-Polymerase von TaKaRa Biomedicals, Shiga, Japan, durchgeführt:

2 µl	humane genomische DNA (ca. 50-100 ng)
5 µl	10 x Puffer II mit MgCl ₂
8 µl	dNTP-Mix (je 2,5 mM)
1 µl	Primer (10 pmol/µl)
0,5 µl	<i>TaKaRa LA Taq-Polymerase</i> (5 U/µl)
auf 50 µl mit H ₂ O	

Folgendes Programm wurde für 15 Zyklen nach einer Denaturierung bei 94°C für 1min. durchlaufen:

Denaturierung:	98°C	20 sec.
Anlagerung:	54-66°C	1 min.
Elongation:	68°C	10-15 min.

Die weiteren 17 Zyklen wurden unter den gleichen Bedingungen durchgeführt, abgesehen davon, dass die Elongationszeit bei jedem Zyklus um 15 sec. verlängert wurde. Auf diese Weise konnte die sinkende Aktivität der Polymerase aufgefangen werden. Abschließend wurde die Elongation der Produkte für ca. 15 min. bei 72°C vervollständigt.

2.2.3.2 Reverse-Transkriptase-PCR (RT-PCR)

Mit Hilfe der Methode der RT-PCR lassen sich RNA-Sequenzen spezifisch amplifizieren, wobei zunächst eine cDNA-Erststrangsynthese mit RNA als Matrize erfolgt und die RNA dadurch in cDNA (komplementäre DNA) umgeschrieben wird. Folgend wird das cDNA-Fragment mittels einer PCR vervielfältigt. Durch diese Methode ist es möglich, Transkripte eines Gens in verschiedenen Geweben nachzuweisen und zu analysieren. Für die in dieser Arbeit durchgeführten RT-PCR-Analysen wurde die SuperScript II Reverse Transkriptase von Invitrogen, Karlsruhe, verwendet. Zuerst wurde die zuvor aus Herzgewebe bzw. Lymphozyten isolierte und anschließend gefällte RNA (siehe 2.2.2) in einer Konzentration von 80 ng/µl mit Random-Primern (Hexanucleotide) und RNase-freiem Wasser für 10 min. bei 70°C inkubiert. Dadurch wurde eine Lösung der RNA-Sekundärstrukturen bewirkt. Die Hexanucleotidprimer sind ein Gemisch aus kurzen Primern (sechs Basen) aller möglichen Basensequenzkombinationen, welche mit der RNA hybridisieren. Anschließend wurde der Ansatz unter Zugabe von Reaktionspuffer, DTT und dNTP 10 min. bei 25°C inkubiert, um eine Hybridisierung der Primer zu erreichen. Abschließend wurde die

Reverse Transkriptase zugegeben und die Reaktion gestartet. Folgender Ansatz wurde verwendet:

x µl	RNA (ca. 4-5 µg)
1 µl	Random-Primer (10 pmol/µl)
4 µl	5 x First-Strand Buffer
2 µl	0,1 M DTT
1 µl	dNTP-Mix (je 10mM)
1 µl	<i>SuperScript II</i> (200 U/µl)
auf 20 µl mit H ₂ O	

Nach Zugabe der SuperScript II erfolgte die reverse Transkription für 50 min. bei 42°C, anschließend eine Denaturierung und Enzyminaktivierung für 15 min. bei 70°C.

2.2.3.3 *PCR an komplementärer DNA (cDNA)*

Für die Amplifizierung der aus kardialer bzw. lymphozytärer RNA gebildeten cDNA wurde meist die Combizyme DNA-Polymerase von Invitex, Berlin, verwendet.

Der Ansatz wurde wie folgt pipettiert:

1 µl	cDNA (ca. 50-100 ng)
5 µl	Puffer III
2 µl	MgCl ₂ (50 mM)
0,5 µl	dNTP-Mix (je 25mM)
10 µl	Enhancer
je 1 µl	Primer (10 pmol/µl)
0,5 µl	<i>Combi Pol-Polymerase</i> (4 U/µl)
auf 50 µl mit H ₂ O	

Nach der Denaturierung der cDNA bei 95°C für 2 min. wurden folgende Temperaturen für 6 Zyklen durchlaufen:

Denaturierung:	95°C	1 min.
Anlagerung (Annealing):	54-65°C	1 min.
Elongation:	68°C	1-4 min.

Die Elongationszeit ist abhängig von der Länge des erwarteten PCR-Produktes, wobei man sich orientierend an die Formel halten kann, dass pro 1 kb des PCR-Produktes 1 min. Elongation nötig ist. Die Annealingtemperatur richtet sich andererseits am

Schmelzpunkt der eingesetzten Primer. Um die im Verlauf der Reaktion nachlassende Aktivität der Polymerase zu kompensieren, wurde folgend die Elongationszeit nach jeweils 6 Zyklen um 15 sec. verlängert, wobei insgesamt 30 Zyklen durchlaufen wurden. Im Anschluss dieser 36 Zyklen wurde eine Elongation bei 68°C für 15 min. durchgeführt, um noch unvollständige PCR-Produkte zu komplettieren. Die PCR-Produkte konnten nun im Agarosegel analysiert und ggf. isoliert werden.

2.2.3.4 Nested-PCR an humaner cDNA

Um auch geringste Template-cDNA-Mengen und somit letztendlich auch RNA-Mengen im Ausgangsgewebe nachzuweisen, wurde bei Amplifikationsschwierigkeiten das nested PCR-Verfahren an humaner cDNA durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden zwei Primerpaare eingesetzt, indem man zunächst mit dem externen Primerpaar ein PCR-Produkt erzeugte. Dieses Produkt wurde dann als Template für die zweite Amplifikation benutzt, welche mit zwei innerhalb des ersten Primerpaares liegenden Primern durchgeführt wurde. Der PCR-Ansatz erfolgte wie unter 2.2.3.3 beschrieben. Das Programm der PCR unterschied sich nur in sofern, dass die Annealingtemperatur der Nested-PCR meist höher gewählt wurde als die der externen PCR, um die Spezifität der Primerbindung zu erhöhen.

2.2.4 Agarosegelelektrophorese

Die elektrophoretische Auftrennung von genomischer DNA, PCR-Produkten und Plasmid-DNA zur photographischen Dokumentation oder zur Isolierung von DNA-Fragmenten erfolgte mittels Agarosegelen in 1 x TBE- bzw. 1 x TAE-Puffer, wobei die Konzentration der Gele in Abhängigkeit von der Fragmentlänge variiert wurde und zwischen 0,5-2% (w/v) Agarose betrug. Für Southern-Blot-Analysen (siehe 2.2.8.2) wurde die restringierte genomische DNA in 0,8%igen Agarosegelen bei 75 V für ca. 6-7 Stunden aufgetrennt. Gele, welche mit 1 x TBE-Puffer gegossen worden waren, mussten nach der DNA-Auftrennung in einem Ethidiumbromidbad gefärbt werden. Dieser Fluoreszenzfarbstoff interkaliert mit der DNA und wird durch Bestrahlung mit UV-Licht sichtbar, so dass die DNA-Banden im Gel erkennbar werden.

Alternativ wurde 1 x TAE-Puffer mit Agarose zum Kochen gebracht und nach dem Abkühlen auf 60°C GelStar Nucleic Acid Stain (BioWhittaker Molecular Applications) in einer Endkonzentration von 0,025 µl/ml zugesetzt, welches eine niedrigere Nachweisgrenze und höhere Empfindlichkeit als Ethidiumbromid aufweist. Zusätzlich entfiel durch diesen Schritt die anschließende Färbung. GelStar® ist ein

Fluoreszenzfarbstoff, welcher an Nukleinsäuren bindet. Nach Anregung durch UV-Licht gibt der Farbstoff Fluoreszenzlicht ab, so dass die Proben in Form von Banden im Gel sichtbar werden.

Die Analyse und die photographische Dokumentation wurden mit einem Transilluminator durchgeführt. Das Verwenden von Markern (z.B. Gene Ruler 1 kb od. 100 bp Marker von MBI Fermentas, Wilna, Litauen) ermöglichte die Größenbestimmung der einzelnen Banden.

2.2.5 Klonierungstechniken

2.2.5.1 TA-Klonierung

Die Klonierung wurde zur Sondenherstellung für Southern Blots verwendet. Außerdem ermöglichte die Klonierungstechnik, dass einzelne, unklare Banden von PCR-Produkten Sequenzierungsreaktionen unterzogen und damit näher analysiert werden konnten. Das Prinzip basiert darauf, dass PCR-Produkte in einen Plasmidvektor inseriert werden, mit welchem anschließend kompetente E.coli-Zellen transformiert werden. Das inserierte PCR-Produkt wird zusammen mit der Plasmid-DNA auf die Tochterzellen übertragen, wodurch das DNA-Fragment in der Zellkolonie zu einer großen Zahl identischer Kopien vervielfältigt wird. Für die Klonierung wurde das TOPO TA Cloning Kit und der pCRII-TOPO-Vektor von Invitrogen, Karlsruhe, verwendet, welcher aus einem Replikationsstart (origin of replication), jeweils einem Antibiotikaresistenzgen für Ampicillin und Kanamycin und einer multiplen Klonierungsstelle besteht. Die Insertion der DNA erfolgt innerhalb dieser sich im lacZ'-Gen befindenden multiplen Klonierungsstelle (MCS) und führt zur Inaktivierung des lacZ'-Gens. Bakterienkolonien, in denen das β -Galaktosidase exprimierende lacZ'-Gen durch die Insertion eines DNA-Fragmentes zerstört ist, bleiben nach Inkubation mit IPTG und X-Gal weiß, während Klone ohne Insertion sich blau färben. Das Antibiotikaresistenzgen führt dazu, dass sich nur Plasmid enthaltende Zellen vermehren.

Aufgrund des mit einem Thyminüberhang konstruierten pCRII-TOPO-Vektors wurde vor der Ligation ein Adenosinüberhang der PCR-Produkte mittels Taq-Polymerase angefügt. Das „A-Tailing“ war nur dann notwendig, wenn für die Amplifikation der PCR-Produkte die CombiPol-Polymerase oder andere Polymerasen verwendet wurden, die glatte Enden produzieren. Folgende Komponenten wurden zusammengesetzt und bei 72 °C für 45 min. inkubiert:

7 µl	PCR-Produkt
1 µl	dATP (20 mM)
1 µl	10 x Puffer
1 µl	<i>Taq-Polymerase</i> (4 U/µl)

Für die Ligation mit Topoisomerase I wurden 1 µl Vektor-DNA mit 4 µl Insert-DNA für 5 min. bei Raumtemperatur inkubiert. Die Topoisomerase I aus dem Vaccinia Virus bindet an die Doppelstrang-DNA und ligiert die Basenpaare spezifisch nach einer 5CCCTT-Sequenz, die Teil des Vektors ist. Dadurch wird die Ligation zwischen Vektor-DNA und Insert-DNA vermittelt. Kompetente E.coli-Zellen wurden zur Transformation auf Eis aufgetaut, mit 2,5 µl des Ligationsansatzes vermischt und unter regelmäßigem Schwenken 20 min. auf Eis gehalten. Es schloss sich ein Hitzeschock bei 42°C für 2 min. an, um die Effizienz der Vektoraufnahme durch die Zellen zu erhöhen. Nach kurzem Abkühlen auf Eis wurden 400 µl LB-Medium zugegeben und der Ansatz für 1 Std. bei 37°C schüttelnd inkubiert. Die transformierten Zellen wurden auf ampicillinhaltigen LB-Agar-Platten, die vorher mit 60 µl X-Gal (Konzentration 40-50 µg/ml) und 10 µl IPTG (Konzentration 300 µg/ml) bestrichen worden waren, ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Für lange PCR-Fragmente zwischen 3-10 kb wurde das TOPO XL PCR Cloning Kit und der pCR-XL-TOPO-Vektor verwendet, der ebenfalls mit einem Thymin-Überhang konstruiert worden ist. Nach dem „A-Tailing“ und der fünfminütigen Ligation wurde 1 µl Stopplösung (MgCl₂, NaCl) zugegeben. Abgesehen von der Kanamycinresistenz des Vektors und der folglich kanamycinhaltigen LB-Agar-Platten verlief das weitere Procedere ähnlich wie beim pCR-TOPO-Vektor. Eine Blau-Weiß-Selektion war nicht erforderlich, da der Vektor eine Fusion aus dem lacZ'-Gen und dem letalen Gen CcdB („control of cell death“) enthält. Durch die Ligation eines PCR-Fragmentes in die MCS kommt es zur Unterbrechung der Expression des lacZ'-CcdB-Gens und damit zum Überleben dieser Zellen, so dass generell nur positive Klone wachsen können.

2.2.5.2 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Restriktionsenzyme sind bakterielle Enzyme, die spezifische 4 bis 8 bp große Sequenzen (Restriktionsschnittstellen) erkennen und beide Stränge der DNA an dieser Stelle schneiden. Mit Hilfe der Restriktion ist es möglich, bestimmte genomische DNA-Stücke zu klonieren, zu analysieren und zu vergleichen. Mittels spezieller

Restriktionskarten wird zunächst die Anordnung verschiedener Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen auf einem bestimmten DNA-Abschnitt ersichtlich.

Durch Restriktionsverdau des pBC KS+- Vektors (pBlueScript) der Firma Stratagene, Heidelberg, mit einer Restriktionsendonuklease wird somit der Einbau von exogenen DNA-Fragmenten ermöglicht. Sowohl die humane DNA als auch der Vektor werden mit geeigneten Restriktionsendonukleasen unter Bildung von kohäsiven Enden geschnitten. Die Verknüpfung der Fragmente geschieht dann durch DNA-Ligase. Das rekombinante Molekül wird durch Transformation in die Bakterienzellen transferiert und mit einem geeigneten Antibiotikum selektiert (siehe 2.2.5.3). Die eigentliche Reaktion erfolgt bei der für das jeweilige Enzym optimalen Reaktionstemperatur (meist bei 37°C), wobei sich die Dauer des Verdau nach der eingesetzten Enzymmenge und der Konzentration der DNA richtet. Um eine Religation des Vektors ohne Insertion zu verhindern, wurde die Vektor-DNA mit alkalischer Phosphatase behandelt. Diese entfernt die terminalen 5-Phosphatgruppen des linearen Vektors und unterbindet dadurch eine Rezirkularisierung des Vektors. Dadurch dass die genomische DNA teilweise gleichzeitig mit zwei verschiedenen Restriktionsendonukleasen geschnitten werden musste, wurden die beiden Restriktionen, in Abhängigkeit davon, ob die eingesetzten Puffer kompatibel waren, nacheinander oder zusammen durchgeführt. Bei Inkompatibilität der jeweiligen Puffer und damit schlechten Standardbedingungen können Restriktionsenzyme auch andere als ihre Erkennungssequenzen schneiden („altered or relaxed specificity = star activity“). Falls eine Inkompatibilität vorlag, wurden zunächst 30 µl Vektor-DNA (ca. 15 ng/µl), 3 µl Enzym (Aktivität abhängig von dem jeweils verwendeten Enzym) und 5 µl 10 x Puffer auf einen Ansatz von 50 µl mit Wasser für 5 Std. bei 37°C inkubiert. Der zuvor mit einem Restriktionsenzym verdaute Ansatz wurde elektrophoretisch aufgetrennt und nach Isolierung der Vektorbande aus dem Agarosegel (siehe 2.2.1.4) für die zweite Restriktion verwendet. Bei einem Endvolumen von 70 µl wurde nochmals über Nacht bei 37°C inkubiert. Nach erneuter Auftrennung und Isolierung der geschnittenen Vektor-DNA aus dem Gel, wurde eine Ligation über Nacht bei 14°C mit dem entsprechenden DNA-Insert durchgeführt:

3 µl	pBC KS+ (geschnitten) (ca. 0,1 µg/µl)
11 µl	Insert (ca. 0,1 µg/µl)
4 µl	5 x Ligase-Puffer
2 µl	<i>T4-DNA-Ligase</i> (1 U/µl)

2.2.5.3 Klonierung von DNA-Fragmenten in pBlueScript

Die geeigneten genomischen Fragmente aus Patienten-DNA wurden durch Restriktionsverdau hergestellt. Anschließend wurde die Patienten-DNA in einem Agarosegel aufgetrennt, der zu klonierende DNA-Bereich ausgeschnitten und aus dem Gel isoliert. Für die Klonierung der geschnittenen DNA wurde der pBC KS+- Vektor der Firma Stratagene, Heidelberg, benutzt. Dieser wurde mit den gleichen Restriktionsenzymen wie die genomische DNA geschnitten, die in seiner multiplen Klonierungsstelle Erkennungssequenzen besitzen (siehe 2.2.5.2).

Die Transformation der E.coli-Zellen mit einem Ligationsansatz von 5 µl erfolgte wie bereits unter 2.2.5.1. beschrieben. Aufgrund der Chloramphenicolresistenz des pBC KS+- Vektors wurden statt der ampicillinhaltigen chloramphenicolhaltige LB-Agar-Platten benutzt. Bedingt durch die Vielzahl der LB-Agar-Platten und der entsprechend hohen Anzahl an rekombinanten Klonen, die auf die Insertion des gewünschten genomischen DNA-Fragmentes überprüft werden mussten, wurde zur Detektierung der Bakterienkolonien die Methode der Koloniehybridisierung (siehe 2.2.10.2) eingesetzt (Grunstein und Hogness, 1975).

2.2.6 DNA-Sequenzierungen

Die automatische Sequenzierung erfolgte nach dem Kettenabbruchverfahren („chain termination method“, Sanger et al., 1977) unter Verwendung von fluoreszenzmarkierten Didesoxynukleotiden. Dazu wurde der ABI 377 DNA „Sequencer“ von Applied Biosystems und der „Big-Dye-Terminator Kit“ der Firma Perkin Elmer, Weiterstadt, benutzt. Das „Cycle-Sequencing“ basiert darauf, dass zunächst ein sequenzspezifischer Primer an die denaturierte DNA bindet. Von diesem Startpunkt aus erfolgt die enzymatische Synthese des komplementären Stranges mittels einer DNA-Polymerase und der vier Desoxynukleotide. Durch Zugabe und den Einbau von Didesoxynukleotiden (ddATP, ddTTP, ddCTP, ddGTP), welche für jede Base eine spezifische Fluoreszenzmarkierung tragen, kommt es zum zufälligen Abbruch der Reaktion und somit zur Bildung von DNA-Fragmenten unterschiedlicher Länge. Diese werden in der Elektrophoreseapparatur des Sequenzierers in einem 6%igen Polyacrylamidgel aufgetrennt.

Um PCR-Produkte ohne vorherige Klonierung direkt sequenzieren zu können, wurde vor dem „Cycle-Sequencing“ ein Verdau mit alkalischer Phosphatase und Exonuklease I durchgeführt, um die im PCR-Ansatz vorhandenen überschüssigen Primer und dNTPs

abzubauen und dadurch Kontaminationen und Konkurrenzreaktionen zu vermeiden. Plasmid-DNA konnte ohne Verdau dem „Cycle-Sequencing“ zugeführt werden. Folgender Ansatz wurde für den DNA-Verdau vorbereitet:

20 µl	PCR-Produkt
1,5 µl	<i>SAP (alkalische Phosphatase)</i> (1 U/µl)
0,8 µl	<i>Exonuklease I</i> (20 U/µl)

Der Ansatz wurde im Thermocycler zunächst für eine Stunde bei 37°C (Temperaturoptimum der Exonuklease I, die alkalische Phosphatase (SAP) benötigt keine besonderen Reaktionsbedingungen und ist sehr widerstandsfähig) und anschließend für 45 min. bei 80°C inkubiert, um die Enzyme zu deaktivieren.

Für das „Cycle-Sequencing“ wurden folgende Komponenten zusammen pipettiert:

2 µl	DNA (aus dem Verdau)
	oder
5 µl	Plasmid-DNA (ca. 1 µg)
1 µl	Primer (10 pmol/µl)
2 µl	Big-Dye-Terminator-Mix mit MgCl ₂
	auf 10 µl mit H ₂ O

Die Kettenabbruchreaktion wurde als PCR im Thermocycler durchgeführt. Nach einer Denaturierung für 1 min. bei 95°C wurden folgende Bedingungen für 27 Zyklen gewählt:

Denaturierung:	95°C	20 sec.
Anlagerung („Annealing“):	50°C	30 sec.
Elongation:	60°C	4 min.

Die fluoreszenzmarkierte DNA wurde durch Sephadex-Gelfiltration gereinigt, welche Substanzen aufgrund ihrer unterschiedlichen Molekulargewichte trennen kann. Verunreinigungen in der DNA-Lösung, wie z.B. überschüssige Nukleotide, wurden beim Durchfluss durch die Säule während einer Zentrifugation bei 3000 rpm für 7 min. zurückgehalten und somit herausgefiltert. Die auf diese Weise gereinigte DNA wurde bei 80°C für 20 min. im Brutschrank inkubiert und getrocknet. Anschließend wurden die Proben in jeweils 4 µl Sequenzierpuffer aufgelöst, für 2 min. bei 90°C denaturiert und auf Eis gestellt.

Zur Vorbereitung des Polyacrylamidgels wurden die beiden Glasplatten mit Wasser und Ethanol gesäubert, getrocknet und fuselfrei unter Einlage der beiden Spacer

zusammengesetzt. Währenddessen wurde die Sequenzgellösung angesetzt und mittels eines Filters entgast und filtriert. Durch Zugabe von TEMED und 10% APS wurde die Polymerisation des Gels begonnen und das Gel luftblasenfrei zwischen die Glasplatten gegossen, bevor der Kamm eingesetzt wurde. Nach zweistündiger Polymerisation konnte das Gel in den Sequenzierer eingesetzt werden. Bevor jeweils 1 µl der denaturierten Proben aufgetragen und die Elektrophorese anschließend bei 2500 V für 8 Std. in 1 x TBE als Laufpuffer gestartet wurde, erfolgte ein kurzer Vorlauf zum Vorheizen bei 1200 V.

Im Laufe der elektrophoretischen Auftrennung der unterschiedlich langen DNA-Fragmente regt ein Laser die vier verschiedenen Farbstoffe zur Fluoreszenz an. Die dabei emittierten Farbsignale werden in einem Photomultiplier verstärkt, einem Detektor zugeleitet und anschließend mit Hilfe eines Computers in die entsprechende Nukleotidsequenz überführt. Die sequenzierten PCR-Produkte konnten mit Hilfe des Programms BlastN von NCBI (National Center for Biotechnology Information) auf Homologien bzw. Differenzen zu bekannten Sequenzen untersucht werden. Auf diese Weise ist es möglich, Polymorphismen oder Mutationen der Patienten-DNA in den unterschiedlichen Genen festzustellen.

Big-Dye-Terminator Kit (Applied Biosystems, Foster City, California)

Sequenzierpuffer:	500 µl	Formamid
	100 µl	Ladepuffer (0,313 M Tris-HCl, 10% SDS, 0,05% Bromphenolblau, 50% Glycerin)
	100 µl	EDTA 25mM
	Lagerung bei -20°C	
Sequenzgellösung:	21 g	Harnstoff
	6 ml	10 x TBE
	8,4 ml	Acrylamidlösung 30%
	20 ml	H ₂ O bidest.
	300 µl	10% APS
	15 µl	TEMED

2.2.7 DHPLC (Denaturing High Performance Liquid Chromatography)

2.2.7.1 Beschreibung und Versuchsbedingungen

Bei der denaturierenden Hochdruckflüssigkeitschromatographie handelt es sich um eine Heteroduplexanalyse, die mit hoher Sensitivität und Spezifität Sequenzvariationen von

PCR-Produkten im Vergleich zur Wildtypsequenz identifizieren kann. Diese Technik, die zur Detektion bislang unbekannter Mutationen bzw. Polymorphismen geeignet ist, findet als zeiteffektives Präscreeningverfahren von PCR-amplifizierten Genabschnitten vor einer gezielten Sequenzierung Anwendung. Die Trennung von DNA-Fragmenten beruht auf den unterschiedlichen Affinitäten von einzel- bzw. doppelsträngiger DNA zur Säulenmatrix und der längen- und vor allem sequenzabhängigen Trennung von doppelsträngiger DNA. Durch die stärkere Haftung verbleiben längere Fragmente länger an der Säule als kürzere. Bei der Amplifikation genomischer, heterozygoter DNA nach Denaturierung und folgender Renaturierung durch langsames Abkühlen werden Hetero- und Homoduplices gebildet. Heterozygote DNA-Abschnitte, wie z.B. Mutationen oder SNP bilden eine Heteroduplex aus einem Strang des Wildtypallels und einem Strang des veränderten Allels. Diese Hybride weisen auf der DHPLC-Säule ein verändertes Retentionsverhalten auf. Heteroduplices werden aufgrund des Mismatches bei Erreichen einer kritischen Temperatur früher getrennt und eluiert als Homoduplices. Für die Experimente wurde das DHPLC-Gerät der Firma Transgenomic verwendet (Wave® Nucleic Acid Fragment Analysis System 3500HT), welches aus einem Autosampler im 2x96-well-Plattenformat, einer Chromatographiesäule, einem Ofen und einem UV-Detektor besteht. Für die DHPLC-Analyse wurde das temperaturabhängige Denaturierungsprofil (Schmelzkurve) der zu untersuchenden DNA-Sequenz mittels computergestützter Schmelzpunktbestimmung der Software Wavemaker 4.1 von Transgenomic, Cambridge, UK, berechnet und die jeweiligen Bedingungen mit Hilfe von Probeläufen ermittelt. Das Programm gibt für die Nukleinsäuresequenz des zu untersuchenden PCR-Produkts eine partiell denaturierende Temperatur an, bei der das Fragment analysiert werden soll. Optimale Versuchsbedingungen liegen vor, wenn das gesamte Fragment zu 70-85% doppelsträngig vorliegt (Schmitt et al., 2000).

Die Analyse der PCR-Produkte (siehe 2.2.3.1.) wurde mit dem Wave Nucleic Acid Fragment Analysensystem der Firma Transgenomic unter Verwendung von C-18 alkylierter, nichtporöser Polystyrenedivinylbenzol-Matrix (DNASep Cartridge) durchgeführt. Die PCR-Fragmente wurden 5 min. bei 95°C denaturiert und 6 µl davon auf die Säule geladen. Die DNA wurde in einem linearen Acetonitrilgradienten (bestehend aus Puffer A und Puffer B), dessen Zusammensetzung je nach Sequenz der Proben von der Software berechnet worden war, bei einem Fluss von 0,9 ml/min. eluiert. Die Analysezeit für ein Fragment lag bei ca. 5 min. und erfolgte, wie am unteren Beispiel aufgeführt:

Beladen: 0,1 min. 49% A, 51% B
 Gradient: 4,0 min. 44% A bis 36% A, 56% B bis 64% B
 Waschen: 0,3 min. 49% A, 51% B
 Äquilibrieren: 0,5 min. 49% A, 51% B
 Puffer A: 50 ml TEAA (Triethylammoniumacetat), 250 µl Acetonitril
 auf 1 l mit autoklaviertem dest. H₂O
 Puffer B: 50 ml TEAA, 250 ml Acetonitril
 auf 1 l mit autoklaviertem dest. H₂O

Die folgende Tabelle zeigt die Versuchsbedingungen für die DHPLC-Analysen des *Fibulin-2-Gens*.

Exon	Länge des PCR-Produktes (bp)	DHPLC-Temperatur (C°)	Anteil des B-Puffers (%)	Forward-Primer	Reverse-Primer
2	863	63,7; 65,2	66	TGCGCCTGCCTG GACTGCACC	TGTGAGGCAGTGC TTAGTGTGCTCC
2	458	63; 65	62	TCACAGCCTCCT GCCCAAACCA	AAGAGAACCTCAT CCTGGATGC
2	467	63,1; 66,1	63	CAGTGCTGCGGG ACGTGGC	TACAGCTATGACC AGGAGGTGG
3	263	61,6; 64,5	58	TGGAGAAGGCAA ATGGGCAGC	TGAGTTTGCCTGC CCAGTAAAGG
4	396	62,5; 64,5	61	CTGCGCAGATTA AGAGTCCTTCC	TGCTGTGGACCTT GGGCAGAGC
5	404	63,1	62	AAGCCACAGGTG ATGATGGACCC	AGTCCTACCTGTG CCAGACTTGGG
6	356	63,5; 66,2	61; 57	ACCCACAGTGT GCACCCAGG	TCTCAGCCACCTA CTCTGACCAAGC
7	294	63,5	59	AGACAGCTCACC ACCTGCAAGC	TGCCCTGTGTGAG AAGGGCAGG
8	224	62,8	56	TCACAGGCCAAC TCAGGTTTGCA	ATGGGGAATGAGC CAGTGTGGACC
9	302	63,4; 65,4	59; 57	TCCAGTTGGTCCT	AGCCACATCTCCG

				TCTGGGCC	AATGGTGAGC
10	257	64,9; 65,9	58; 56	TGCCTCCAGTAG	AGGGCTGCTGAGT
				AGCCCTAGGC	GTAAGGCAGG

Tab. 2.1: Bedingungen der DHPLC. In der Tabelle sind die Länge der PCR-Produkte von *FBLN2* sowie die für die Amplifikation verwendeten Primer dargestellt. Die Primer wurden so gewählt, dass die flankierenden Intronbereiche bei der Amplifikation mit erfasst wurden. Um das gesamte Exon 2 analysieren zu können, wurden mehrere Primerkombinationen benutzt. Die Schmelztemperaturen und der Anteil des Puffer B stellen wichtige Parameter der DHPLC-Analyse dar.

2.2.7.2 Auswertung der Ergebniskurven

Bei Heterozygoten zeigt das Chromatogramm zwei Peaks. Der erste wird durch die thermolabileren Heteroduplices, der zweite durch die Homoduplices gebildet. Zum Teil kann man nur eine zusätzliche Schulter im Homoduplexpeak erkennen, die auf eine Sequenzvariante schließen lässt (Schmitt et al., 2000). Wie beim Wildtyp ist bei homozygoten Anlageträgern ein homogener Peak im Chromatogramm zu sehen (Abb. 2.3). Durch Zugabe von Wildtyp-DNA in gleichen Teilen kann die homozygote Mutation allerdings deutlich gemacht werden (Huber et al., 1993).

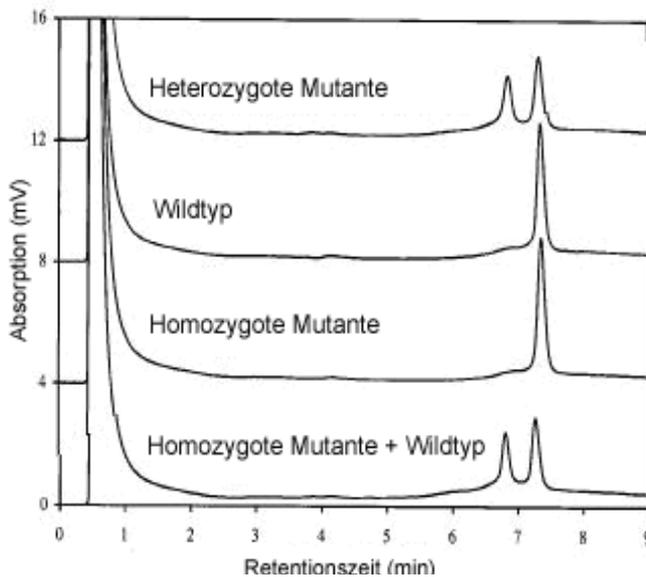


Abb. 2.3: DHPLC-Chromatogramm. Die Abbildung zeigt verschiedene Mutationsformen mit den entsprechenden Mustern der DHPLC-Ergebniskurven. Heterozygote Mutationen zeigen einen Heteroduplex-Peak, welcher vor den Homoduplices eluiert. Durch Mischen mit dem Wildtyp wird bei Homozygoten ein heterozygoter Zustand erreicht (nach Schmitt et al., 2000).

2.2.8 Southern-Blot-Analysen

2.2.8.1 Restriktionsverdau für Southern-Blot-Analysen

Zunächst wurde die genomische DNA von Patienten bzw. Kontrollen mit unterschiedlichen Restriktionsendonukleasen gespalten, welche Schnittstellen in bzw. um den zu untersuchenden Genabschnitt besaßen. Der Restriktionsverdau der DNA

dient dazu, mögliche Sequenzunterschiede der Patienten-DNA im Vergleich zur Kontroll-DNA zu eruieren, die sich in Form von genomischen Rearrangements (z.B. Inversionen, Deletionen, Duplikationen) äußern können. Durch diese Unterschiede können Erkennungsstellen von Restriktionsenzymen entstehen oder verschwinden, so dass sich das Muster der Restriktionsfragmente aus einem Genombereich zwischen Patienten und Kontrollen unterscheiden kann. Beispielsweise kann der Verlust einer Schnittstelle zwei kleine Fragmente durch ein großes ersetzen. Der Restriktionsansatz wurde wie folgt pipettiert und über Nacht bei 37°C inkubiert:

20 µl	DNA (7 – 10 µg)
6 µl	10 x Puffer (Endkonzentration 1 x)
4 µl	<i>Restriktionsendonuklease</i>
mit H ₂ O auf 60 µl	

2.2.8.2 Southern Blot

Anhand der von Ed Southern 1975 beschriebenen Methode können DNA-Fragmente nach der Auftrennung in Agarosegelen auf Nylonmembrane übertragen werden, um anschließend durch Hybridisierung radioaktiv markierter Sonden einzelne DNA-Fragmente spezifisch nachzuweisen. Die verdaut DNA wurde unter Zugabe von 1/5 Volumen eines Gelladepuffers (MBI) auf ein 0,8%iges Agarosegel aufgetragen und für 6-7 Std. bei 75 V aufgetrennt. Das Agarosegel wurde in einem Ethidiumbromidbad gefärbt und neben einem fluoreszierenden Lineal photographisch dokumentiert, um später die Signale auf dem Röntgenfilm den entsprechenden DNA-Banden im Agarosegel zuordnen zu können. Das Gel wurde für 2x20 min. in Denaturierungslösung und anschließend für 2x20 min. in Neutralisierungslösung geschwenkt und nach kurzem Waschen in 2 x SSC auf einen Filterpapierstreifen (Whatman-Papier) gelegt, dessen Enden in 20 x SSC eintauchten. Auf das Gel wurde eine auf die gleiche Größe zurechtgeschnittene Membran (Nylon: Hybond-N+, Amersham Biosciences, Little Chalfont, England), die zuvor in 2 x SSC angefeuchtet worden war, luftblasenfrei aufgelegt und mit den einzelnen Positionen der Taschen markiert. Die Membran wurde mit zwei ebenfalls in 2 x SSC getränkten Filterpapieren bedeckt. Ein Stapel Papierhandtücher auf dem Blot fungierte als Saugmaterial und wurde mit einem Gewicht beschwert. Während des Transfers über Nacht wurde der 20 x SSC-Puffer durch das Gel in das trockene Filterpapier gesaugt und nahm die DNA aus dem Gel mit, die durch die Nylonmembran zurückgehalten wurde und somit daran haften blieb. Nach

dem Transfer folgte eine Spülung der Membran in 2 x SSC und eine Fixierung der übertragenen DNA auf der Nylonmembran durch Vernetzung mit UV-Licht („Crosslinking“) in einem Stratalinker (Stratagene, Heidelberg). Die Membran wurde entweder direkt für eine Hybridisierung benutzt oder bei 4°C gelagert.

2.2.9 Herstellung radioaktiver DNA-Sonden

DNA-Proben wurden mit der Methode nach Feinberg und Vogelstein (1983) für Hybridisierungen von Southern und Northern Blots sowie für Koloniehybridisierungen radioaktiv markiert. Dazu wurde das Megaprime DNA Labelling System der Firma Amersham Biosciences, Little Chalfont, England, benutzt. Es handelt sich um eine „Random-Primed“-Markierung, bei der Hexanukleotide statistischer Zusammensetzung als Startpunkte für die Synthese eines komplementären DNA-Stranges mit Hilfe des Klenow-Fragments der DNA-Polymerase I dienen, wobei radioaktiv markierte Nukleotide eingebaut werden. 20 – 40 ng der zu markierenden DNA wurden mit Wasser auf ein Volumen von 22 µl aufgefüllt, bei 95°C für 5 min. denaturiert und auf Eis abgekühlt. Parallel wurden die für die Markierungsreaktion benötigten Komponenten zusammen pipettiert:

4 µl	dCTP (0,5 mM)
4 µl	dGTP (0,5 mM)
4 µl	dTTP (0,5 mM)
5 µl	Primer-Mix
5 µl	Reaktionspuffer
2 µl	<i>Klenow-Enzym</i> (1 U/µl)

Die denaturierte Sonde und 4 µl [α -³²P] dATP (10 µCi/µl) wurden zu dem Ansatz zugegeben und für 1 h bei 37°C inkubiert. Um nicht eingebaute radioaktive Nukleotide von der Sonde zu trennen, wurde die markierte DNA-Sonde nach Beendigung der Reaktion mittels einer Säule aufgereinigt (Nuc Trap Probe Purification Columns, Stratagene, Heidelberg). Nachdem die Säule mit 120 µl STE-Puffer äquilibriert worden war, wurden ebenfalls mit einer Spritze die Sonde, dann 85 µl STE-Puffer und zuletzt Luft durch die Säule gedrückt. Das dabei erhaltene Volumen wurde in einem Cup mit Sicherheitsverschluss aufgenommen. Durch Messen der Sonde und der benutzten Säule mit einem Geigerzähler konnte die Effizienz der Markierungsreaktion beurteilt werden. Bevor die radioaktiv markierte Sonde für eine Hybridisierung eingesetzt werden

konnte, wurde sie unter Zugabe von 150 µl Heringssperma-DNA für 5 min. bei 95°C denaturiert.

2.2.10 Hybridisierungstechniken

2.2.10.1 *Hybridisierung von Southern-Blot-Membranen mit radioaktiv markierten DNA-Sonden*

Die Prähybridisierung und die Hybridisierung der DNA-Filter, auf die eine DNA-Sonde hybridisiert werden sollte, wurde in langsam, horizontal um die Längsachse rotierenden Glaszylindern durchgeführt. Dabei wurden die DNA-Filter in den Glaszylinder eingerollt gesteckt, indem die mit Nukleinsäuren beladene Seite in das Lumen zeigte. Die Prähybridisierung wurde bei der gewünschten Temperatur zwischen 60-65°C in ca. 20 ml Hybridisierungslösung für 1-2 Stunden in einem Rollofen durchgeführt. Die radioaktiv markierte Sonde (siehe 2.2.9.) wurde mit 150 µl Heringssperma-DNA für 5 min. bei 95°C denaturiert und anschließend auf Eis gekühlt, bevor sie in die Hybridisierungslösung pipettiert wurde. Die Heringssperma-DNA diente zur Absättigung unspezifischer Bindungen auf der Membran.

Die Hybridisierung erfolgte über Nacht unter den gleichen Bedingungen wie die Vorhybridisierung. Die verwendete Hybridisierungslösung mit der Sonde konnte nach erneuter Denaturierung für eine weitere Hybridisierung eingesetzt werden und wurde zwischenzeitlich bei 4°C gelagert. Die DNA-Filter wurden im Glaszylinder zweimal in Waschlösung 1 durch leichtes Schwenken gewaschen. Je nach gewünschter Stringenz wurde ein Waschschrift bei einer Temperatur zwischen 60-65°C in Waschlösung 1 für ca. 10 min. durchgeführt. Für eine höhere Stringenz wurde der Filter bei der zuvor gewählten Temperatur für 5-10 min. in Waschlösung 2 gewaschen. Nach jedem Waschschrift wurde die verbleibende Aktivität des Filters mittels eines Geigerzählers gemessen und auf diese Weise die Effizienz des Waschvorgangs beurteilt.

Abschließend wurde der Filter feucht in eine Folie eingeschweißt und in einer Autoradiographiekassette mit Verstärkerfolien und Röntgenfilm bei -80°C exponiert. Die Entwicklung des Films erfolgte nach einigen Stunden bis hin zu 14 Tagen in Abhängigkeit von der Aktivität des Filters und der daraus resultierenden Intensität der Signale. Durch Strippen im Wasserbad bei 90°C für 10 min. mit 0,5%iger SDS-Lösung konnte die gebundene Sonde abgewaschen und so der Filter mehrfach verwendet werden.

Waschlösung 1:	2xSSC, 0,2% (w/v) SDS
Waschlösung 2:	0,2xSSC, 0,2% (w/v) SDS
Hybridisierungslösung:	2xSSC, 0,2% (w/v) SDS, 1 x Denhardt`s Lösung 5% (w/v) Dextransulfat
Stripp-Lösung:	0,5% (w/v) SDS
Heringssperma-DNA:	10 mg/ml

2.2.10.2 Koloniehybridisierung

Die Agarplatten wurden nach der Inkubation bei 37°C über Nacht für ca. 2 Std. bei 4°C gelagert. Anschließend wurde ein Rundfilter in der entsprechenden Größe von jeder Platte gezogen. Dabei wurde der Filter mit fünf asymmetrischen Punkten markiert und mit der markierten Seite für 1 min. auf die Agarplatte gelegt, wobei die Punkte auf den Boden der Platte übertragen wurden. Nach dem Abziehen wurde der Filter zur Lyse der Bakterienzellen mit der DNA-Seite nach oben für 5 min. auf einem in 10% SDS getränkten Filterpapier inkubiert. Es folgte eine Inkubation für 3 min. auf Filterpapier, welches in Denaturierungslösung getränkt worden war, danach für 10 min. auf Filterpapier mit Neutralisierungslösung. Abschließend wurde der Filter für 2 x 5 min. auf 2xSSC gelegt. Die DNA wurde durch UV-Bestrahlung (Crosslinking) an den Filter gebunden, der feucht in den UV-Stratalinker gelegt worden war. Mittels radioaktiver Hybridisierung von DNA-Sonden auf die Rundfilter konnten anschließend positive Klone durch die Signale und deren Lokalisierung mit Hilfe der auf dem Filter und auf der Platte vorhandenen asymmetrischen Markierungen identifiziert werden. Bei Vorhandensein vieler weißer Kolonien in der Nähe eines Signals wurden diese auf eine Agar-Platte ausplattiert und konnten nach erneuter Hybridisierung einwandfrei identifiziert werden.

2.2.11 Northern Blot

Mit Hilfe des Northern-Blot-Verfahrens kann RNA aus einem Agarosegel auf eine Membran übertragen werden. Dadurch kann die Expression eines Gens sowie seine Transkriptgröße in verschiedenen Geweben nachgewiesen werden. Durch die Verwendung des Multiple Tissue Northern Blots der Firma Clontech, Heidelberg, für die Northern-Blot-Analysen konnte auf eine denaturierende Agarose-Gelelektrophorese zur Auftrennung der RNA und auf den folgenden RNA-Transfer auf Nylonmembranen verzichtet werden. Um die Integrität der verwendeten RNA beurteilen zu können, wurde parallel eine Kontrollhybridisierung mit dem ubiquitär exprimierten *β -Actin-Gen* durchgeführt. Die Herstellung der für das Northern-Blotting benötigten radioaktiv

markierten cDNA-Sonden erfolgte wie unter 2.2.9. aufgeführt, die Hybridisierung der Northern Blots mit den radioaktiv markierten cDNA-Sonden wie unter 2.2.10.1 beschrieben. Die RNA-Filter wurden für 30 min. bei Raumtemperatur in Waschlösung 1 und nachfolgend für 40 min. bei 50°C in Waschlösung 2 gewaschen (siehe 2.2.10.1). Anschließend wurden die Filter eingeschweißt, bei RT auf einer Phosphorimagerplatte für 4 – 5 Stunden exponiert und im Phosphorimager entwickelt oder alternativ in einer Filmkassette bei -80°C exponiert und entwickelt (siehe 2.2.10.1

III. Ergebnisse

3.1 *Das Fibulin-2-Gen*

3.1.1 Beschreibung und Funktion des *Fibulin-2-Gens*

Das *Fibulin-2-Gen* wurde erstmals im Rahmen einer Sequenzanalyse von cDNA-Klonen aus einer murinen Fibroblastenbibliothek aufgrund seiner Homologie zu *Fibulin-1* identifiziert (Pan et al., 1993). Das *Fibulin-2-Gen* befindet sich an dem zum Telomer gelegenen Ende des bereits beschriebenen Locus auf Chromosom 3p25.1 und besteht aus 18 Exons (NM_001004019, GI 51873052). Die Gensequenz umfasst ca. 89 Kilobasen, die kodierende Sequenz 4334 Basenpaare. Auf dem genomischen Klon RP11-470I10 (GI 12084025) ist das Gen zwischen den Positionen 109826 und 20527 lokalisiert. Alternativ gespleißte Transkriptionsvarianten konnten identifiziert werden. Aktuell sind drei Transkriptionsvarianten (GI 51873052, GI 259013546 und GI 51873054) bekannt, welche für zwei unterschiedliche Isoformen a und b kodieren.

Das *FBLN-2-Gen* kodiert für das extrazelluläre Matrixprotein Fibulin-2 (1231 Aminosäuren, NP_001004019, GI 51873053), welches zu einer aus fünf weiteren extrazellulären Proteinen (Fibulin 1-6) bestehenden Familie gehört. Es handelt sich um ein hochkonserviertes Protein, da eine ausgeprägte Homologie in der Aminosäuresequenz zum murinen *Fibulin-2-Gen* auf Chromosom 6 (Bande D-E) zu finden ist (Zhang et al., 1994). Das Fibulin-2-Protein besteht aus drei Domänen: die erste Domäne enthält drei Anaphylatoxin-ähnliche Segmente, gefolgt von der zentralen Region mit 10 Kalzium-bindenden EGF-ähnlichen Wiederholungen (EGF-like repeats) und einem 115-residue C-terminalen Segment (Domäne III) (Zhang et al., 1994).

In einigen Studien konnte gezeigt werden, dass sowohl Fibulin-1 als auch Fibulin-2 eine spezifische Rolle in der embryonalen Entwicklung unterschiedlicher Organe bei Mäusen und Menschen spielen und bereits zu Beginn der Organogenese exprimiert werden (Zhang et al., 1996, Miosge et al., 1996). Beide Proteine sind in der Differenzierung von kardialen, skeletalen und neuronalen Strukturen involviert. Eine starke Expression von Fibulin-1 und Fibulin-2 wurde während der Herzentwicklung bei Mäusen im Endokardkissen (ECM) beobachtet, aus dem sich später die Herzklappen und das Herzseptum entwickeln (Zhang et al., 1993, Zhang et al., 1995, Tsuda et al., 2001). Im adulten Organismus persistieren beide Proteine in diesen Strukturen und führen zur Aufrechterhaltung der Dehnbarkeit von Herzklappen. Miosge et al. (1996) konnten

nachweisen, dass Fibuline an komplexen supramolekularen Strukturen in der Hyaloranmatrix des Endokardkissens beteiligt sind und im Verlauf der kardialen Organogenese alternierende Bindungen zu verschiedenen extrazellulären Liganden eingehen. Weiterhin sind Fibuline an der Bildung anderer supramolekularer Strukturen wie Basalmembrannetzwerke, elastische Fasern, verschiedene Typen von Mikrofibrillen und Proteoglykanaggregaten involviert und interagieren mit zahlreichen anderen extrazellulären Proteinen, darunter u. a. Fibrillin-1 (Reinhardt et al., 1996), Tropoelastin (Sasaki et al., 1999), verschiedene Proteoglycane (Olin et al., 2001) und Laminin (Utani et al., 1997).

Letztlich wird angenommen, dass Fibulin-2 an der Vernetzung und an der Stabilität der extrazellulären Matrix (ECM) und somit auch am Zellzusammenhalt und möglicherweise an der Signaltransduktion beteiligt ist. Durch diese Funktion einerseits und der starken Expression im Verlauf der embryonalen Herzentwicklung bei der Maus andererseits stellt das *Fibulin-2-Gen* einen sehr guten Kandidaten für eine ursächliche Beteiligung an der ARVC bzw. DCM dar.

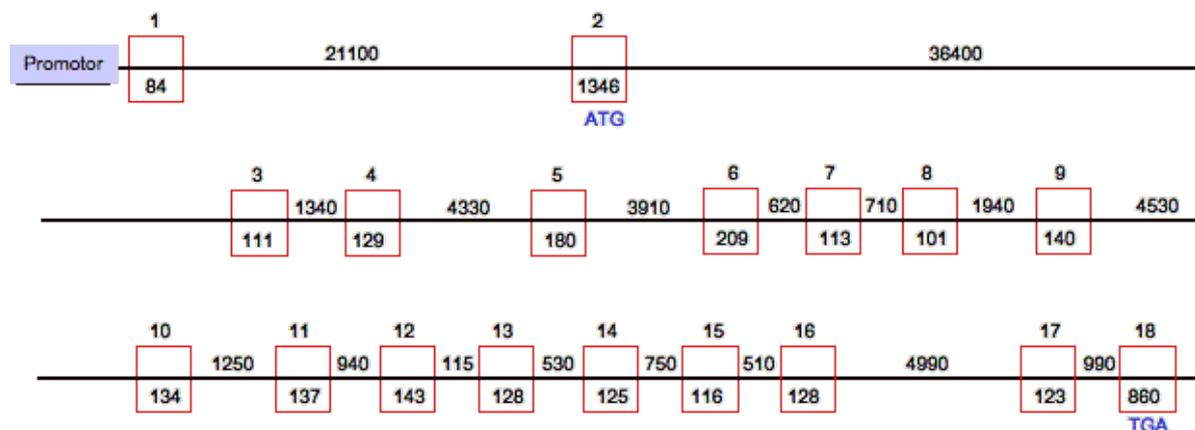


Abb. 3.1: Genomische Struktur der Transkriptionsvariante 1 von *FBLN2*. Die roten Kästchen stellen die 18 Exons des Gens mit Angabe der Exongröße dar. Zwischen den Exons ist die Größe der verschiedenen Introns in Basenpaaren angegeben. Das Startcodon liegt im Exon 2 auf Position 126 des kodierenden Klon NM_001004019 (GI 51873052), das Stoppcodon auf Position 3821 von Exon 18.

3.1.2 Mutationsscreening und molekulargenetische Analysen des *Fibulin-2-Gens*

3.1.2.1 Analyse des *Fibulin-2-Gens* auf genomischer und cDNA-Ebene

Die Sequenzierung des Promotorbereiches umfasste 2 kb vor Exon 1 (auf dem genomischen Klon RP11-470I10 zwischen den Positionen 110000 und 112000). Genetische Aberrationen konnten nicht gefunden werden. Ein einziger homozygoter Basenaustausch Cytidin statt in der Datenbank Thymidin wurde bei einer betroffenen

Person auf Position 111589 (GI 12084025) identifiziert. Dieser SNP ist bisher nicht beschrieben worden. In der kodierenden Sequenz wurden sowohl auf genomischer als auch auf cDNA-Ebene folgende Polyporphismen entdeckt:

Nukleotidposition	Lokalisation im Gen	Aminosäure	Vergleich mit Datenbank
g. 87460 c. 1260 G>A	Exon 2 Herz	Asp379Asn D => N	nicht bekannt
g. 21246 c. 3605 G>A	Exon 18 Betroffene	Thr1160 kein Austausch	bekannt
g. 21114 c. 3737 C>T	Exon 18 Betroffene	Asp1204 kein Austausch	bekannt

Tab. 3.1: Einzelnukleotidpolymorphismen im *FBLN2*-Gen. Die angegebenen Nukleotidpositionen beziehen sich auf den genomischen Klon RP11-470I10 (GI 12084025) bzw. auf die kodierende Sequenz NM_001004019 (GI 51873052).

Die Sequenzierung von kodierender DNA ergab eine ca. 340 bp große Deletion (fehlendes Fragment) in Exon 2 zwischen den Positionen 741 und 1084 der kodierenden Sequenz NM_001004019 (GI 51873052) bzw. 87980 und 87636 des genomischen Klons RP11-470I10 (GI 12084025). Dieses fehlende Fragment konnte sowohl anhand kardialer und lymphozytärer cDNA von Betroffenen als auch von Kontrollpersonen reproduziert werden. Eine Variante dieser Deletion konnte bei einem Betroffenen gefunden werden. Dabei war die Deletion um ca. 20 bp in 5'-Richtung verschoben und zwischen den Positionen 719 und 1051 der kodierenden Sequenz NM_001004019 bzw. zwischen 88002 und 87670 des genomischen Klons RP11-470I10 lokalisiert.

3.1.2.2 Southern Blot des *Fibulin-2*-Gens

Um den 5'-Bereich von *Fibulin-2* genauer analysieren zu können, wurde DNA von Betroffenen und Kontrollen nach Erstellung von Restriktionskarten mit verschiedenen Enzymen restringiert. Die Southern Blots der restringierten DNA wurden jeweils mit 3 verschiedenen Sonden hybridisiert, die den Promotorbereich, Exon 1, Exon 2 und Exon 3 umfassten. Von dem restlichen Gen wurden keine Southern Blots durchgeführt, da es aus den Ergebnissen der Sequenzanalysen keinen Hinweis für ein genomisches

Rearrangement in diesem Bereich gab. Alle genomischen Polymorphismen konnten zudem ebenfalls auf cDNA-Ebene reproduziert werden.

Die Restriktion im Promotorbereich und Exon 1 zeigte ein identisches Muster zwischen Kontrollen und betroffenen Personen. Die Analyse des Exon 3 zeigte ebenfalls keine Unterschiede zwischen den verschiedenen Populationen. Im Gegensatz dazu fiel im Rahmen der Auswertung von Exon 2 ein unterschiedliches Bandenmuster zwischen Kontrollen und Betroffenen auf. Hierzu war eine 900 bp große Sonde benutzt worden. Bei betroffenen Personen wurden zusätzliche Banden nach Restriktion mit den Enzymen EcoR I, Pst I, BamH I und Sph I gefunden. Zur weiteren Spezifizierung dieser Veränderungen wurden DHPLC-Analysen von *FBLN2* an ARVC-Patienten und Kontrollpersonen durchgeführt. Erst später gelang der Nachweis des normalen Restriktionsmusters bei einem ARVC-Patienten im Southern Blot, so dass nicht mehr von einer Krankheit auslösenden Veränderung ausgegangen werden konnte. Nach genauer Rekonstruktion des Versuchablaufs handelte sich bei diesen zusätzlichen Banden a.e. um eine Plasmidkontamination.

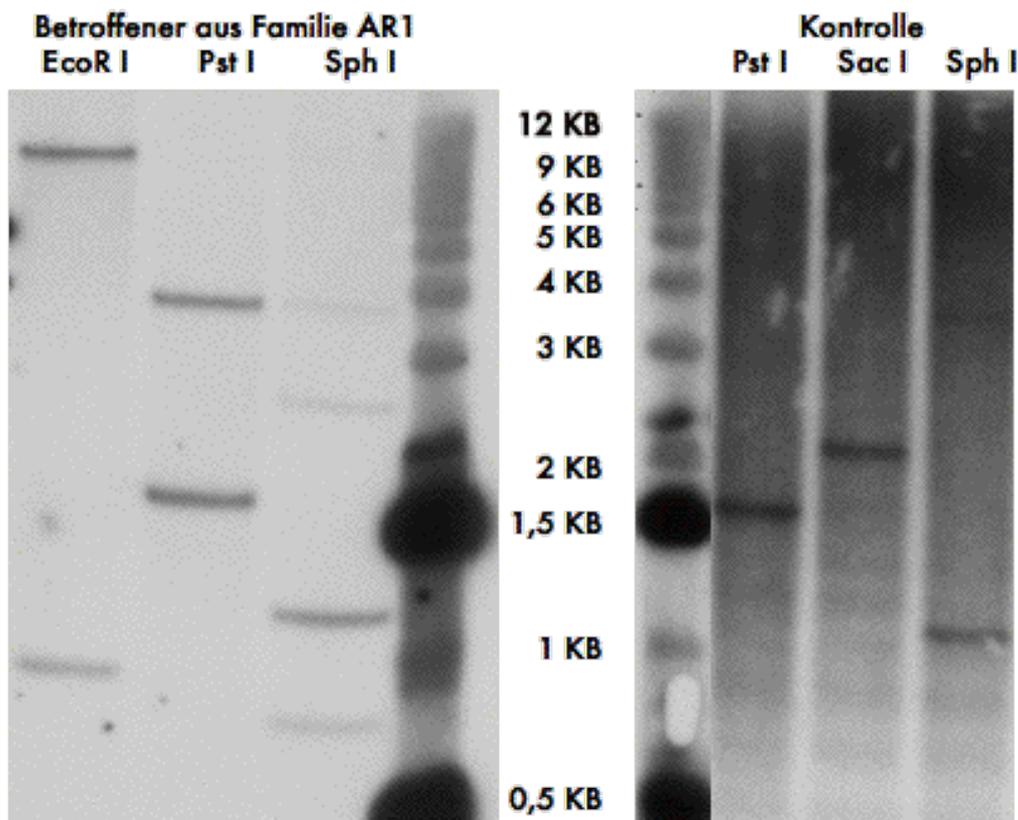


Abb. 3.3: Southern Blot von Exon 2 des *FBLN2*-Gens. In der Abbildung ist ein unterschiedliches Restriktionsmuster zwischen Betroffenen aus der Familie AR1 und Kontrollen mit den Restriktionsendonukleasen Pst I und Sph I zu erkennen. Die Restriktion beim Betroffenen ergab mit der Endonuklease Pst I eine zusätzliche 3,8 kb große Bande und mit der Endonuklease Sph I zusätzliche Banden bei 2,4 und 0,8 kb. Andere ARVC-Patienten wiesen dieses Restriktionsmuster schlussendlich nicht auf, so dass es sich nicht um die Krankheit auslösende Mutation handelt.

3.1.2.3 *Untersuchung zur Expression des Fibulin-2-Gens in verschiedenen menschlichen Geweben (Northern Blot)*

Um die Expression des *Fibulin-2-Gens* in unterschiedlichen Geweben zu untersuchen, erfolgten Northern-Blot-Analysen. Dazu wurde ein Multiple tissue Northern Blot, der je 2 µg elektrophoretisch getrennte poly(A)⁺-RNA verschiedener Gewebe enthält (Clontech), mit einer Fibulin-2-RNA-Sonde hybridisiert.

Fibulin-2 wird vorwiegend in der Herzmuskulatur, quergestreiften Skelettmuskulatur und in der Plazenta exprimiert (Abb. 3.4). In Leber und Lunge ist eine intermediäre Expression festzustellen. In geringen Mengen ist das Transkript jedoch auch in Gehirn, Pankreas und Niere zu finden. In allen Geweben konnte das zu erwartende Transkript von ca. 4,4 kb gesehen werden. Zusätzliche Transkripte wurden nicht identifiziert.

Der Vergleich im Northern Blot zwischen kardialer ARVC-RNA und lymphozytärer Kontroll-RNA, welche mit der Fibulin-2-RNA-Sonde hybridisiert worden waren, ergab eine stärkere Expression im Herzgewebe.

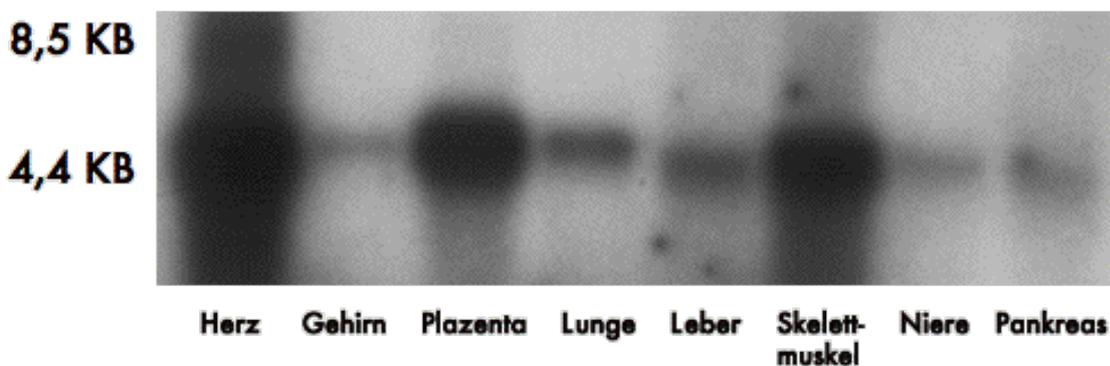


Abb. 3.4: Northern Blot des *FBLN2-Gens*. Im Bild ist das reguläre, 4,4 kb große Transkript zu erkennen. Eine dominierende Expression des Gens in Herz, Skelettmuskel und Plazenta ist evident.

3.1.2.4 *Mutationsscreening mittels denaturierender Hochdruckflüssigkeitschromatographie (DHPLC) an 94 Kontrollpersonen*

Um nachzuprüfen, ob es sich bei dem im Southern Blot beschriebenen, zunächst nur bei ARVC-Patienten entdeckten Restriktionsmuster um die Krankheit auslösende Mutation und nicht um eine genetische Variante handelt, wurde die kodierende Sequenz des *FBLN2-Gens* von 94 ARVC-Patienten und Kontrollpersonen untersucht. Bei den Kontrollen handelte es sich vorwiegend um Patienten, die an einer dilatativen Kardiomyopathie erkrankt sind.

Die Exons 2-10 des *Fibulin-2-Gens* wurden zunächst mittels RT-PCR an genomischer DNA amplifiziert (Tab. 2.1, Kapitel II). Zur Optimierung der Versuchsbedingungen wurde im Vorfeld mit Hilfe einer Konzentrationsmessung darauf geachtet, dass die

Konzentration der jeweiligen DNA-Proben zwischen 15 ng/µl und 100 ng/µl liegt. Auch die Primerkombinationen wurden optimiert. Anschließend wurde für das Vorscreening von Mutationen die DHPLC-Analyse (denaturing high performance liquid chromatography) als schnelle und präzise Methode verwendet. Sie basiert auf der unterschiedlichen Durchflussgeschwindigkeit verschieden stark negativ geladener DNA-Stränge in einer Chromatographiesäule. Es wird die variable Retention von Hetero- und Homoduplex-DNA an der Säulenmatrix ausgenutzt. Durch diese Methode lassen sich Polymorphismen, kleinere Insertionen und Deletionen in DNA-Fragmenten bis zu einer Länge von 1,5 kb detektieren. Die Versuchsbedingungen der einzelnen PCR-Produkte sind im Kapitel II beschrieben (siehe 2.2.7).

Die Auswertung umfasste den Vergleich der Ergebniskurven (Peakmuster) zwischen den einzelnen Individuen eines bestimmten PCR-Produktes bei identischer Analysetemperatur. DNA-Proben, deren Ergebniskurven eine andere Morphologie bzw. zwei Peaks zeigten, wurden weiteren Untersuchungen zugeführt. Es erfolgte die Sequenzierung des auffälligen PCR-Produktes, um die Sequenzvariante genau erfassen zu können (Tab. 3.2). Die auffälligen Proben der PCR-Produkte von Exon 3 und 5-10 wurden im Rahmen dieser Arbeit nicht weitergehend analysiert, da zwischendurch herausgefunden wurde, dass das unterschiedliche Bandenmuster mit der Sonde von Exon 2 im Southern Blot bei einigen betroffenen Personen durch eine Plasmidkontamination entstanden war.

Exon	Länge des PCR-Produktes (bp)	Anzahl der abweichenden Peakmuster	Sequenzvariante	Aminosäureaustausch
2	863	2	g. 88679 G/A (Intron 1)	Kein, nicht bekannt
2	863	2	g. 88601 c. 120 T/C (Exon 2)	Kein, 5'UTR, bekannt
2	863	2	g. 88431 c. 290 T/C (Exon 2)	Cys55, kein Austausch, bekannt
2	458	2	g. 87461 c.1259 G/A (Exon 2)	Arg378, nicht bekannt, kein Austausch
2	458	2	g. 87369 c. 1351 C/T (Exon 2)	Pro409Leu, P => L, nicht bekannt

2	467	1	g. 87665 c. 1056 G/A (Exon 2)	Ala311Thr, A => T, nicht bekannt
3	263	2	nicht untersucht	entfällt
4	396	3	g. 49526 G/A (Intron 3)	Kein, nicht bekannt
4	396	3	g. 49395 c. 1586 G/A (Exon 4)	Lys487, nicht bekannt, kein Austausch
4	396	3	g. 49179 C/T (Intron 4)	Kein, nicht bekannt
5	404	1	nicht untersucht	entfällt
6	356	3	nicht untersucht	entfällt
7	294	1	nicht untersucht	entfällt
8	224	2	nicht untersucht	entfällt
9	302	3	nicht untersucht	entfällt
10	257	keine	nicht untersucht	entfällt

Tab. 3.2: Ergebnisse und Auswertung der DHPLC-Analyse. Zu jedem PCR-Produkt ist die Anzahl der von der Norm abweichenden, unterschiedlichen Peakmuster angegeben. Die dazu gehörigen DNA-Proben wurden anschließend zur Spezifizierung der Sequenzvariante sequenziert. Die Positionen der angegebenen Polymorphismen beziehen sich auf den genomischen Klon (g.) RP11-470I10 (GI 12084025) und auf die kodierende Sequenz (c.) NM_001004019 (GI 51873052). Dahinter ist die genaue Lokalisation des SNP im *FBLN-2-Gen* angegeben. Außerdem wurde mit Hilfe von Datenbankrecherchen herausgefunden, ob der Basenaustausch zu einem konsekutiven Aminosäureaustausch führt oder nicht.

3.2 *Das WNT7A-Gen (wingless-type MMTV integration site family, member 7A)*

3.2.1 Beschreibung und Funktion des *WNT7A-Gens*

Das *WNT7A-Gen* gehört zu einer großen Genfamilie, welche für hochkonservierte, Cysteinreiche Glykoproteine kodiert. Diese Signalmoleküle haben wichtige Funktionen in der Onkogenese (Nusse et Varmus, 1982) sowie in verschiedenen Entwicklungsprozessen einschließlich Regulation von Zelldifferenzierung und Strukturierung während der Embryogenese (McMahon et al., 1992). *WNT7A* scheint nicht nur in der embryonalen Extremitätenentwicklung (Johnson et Tabin, 1997), sondern auch in der sexuellen Differenzierung der Genitalanlagen und Erhalt der adulten Uterusfunktion eine wichtige Rolle zu spielen. Parr und McMahon (1998) zeigten im Tiermodell, dass Mäuse mit einer homozygoten Mutation im *WNT7A-Gen* eine gestörte Genese der Reproduktionsorgane aufweisen. Männliche Mäuse, denen das Signalmolekül *WNT7A* fehlte, entwickelten aufgrund der Abwesenheit des Rezeptors für das Anti-Müller-Hormon ein Müller-Gang-Persistenzsyndrom mit

konsekutiver Infertilität. *WNT7A*-defiziente weibliche Mäuse zeigten eine abnormale Entwicklung der Müller-Gang-Abkömmlinge, Uterus und Eileiter, so dass ebenfalls eine Unfruchtbarkeit resultierte.

Stenman und Kollegen (2008) konnten mittels genetischen Mausmodells nachweisen, dass *WNT7A* und *WNT7B* via kanonischem Wnt-Signalweg an der Differenzierung von Gefäßen im ZNS beteiligt sind. Weiterhin gibt es Hinweise dafür, dass *WNT7a* an der Differenzierung und Proliferation neuronaler kortikaler Vorläuferzellen involviert ist (Hirabayashi et al., 2004).

Experimente an pluripotenten murinen Zelllinien zeigten, dass die kanonische Wnt-Signalkaskade unabdingbar für die kardiale Differenzierung und Myogenese bei Säugetieren ist (Nakamura et al., 2003). Zusätzlich wurde eine gesteigerte Expression von *WNT7A* im Zusammenhang mit der Differenzierung des kardialen Erregungsleitungssystems gefunden (Bond et al., 2003).

Beim Menschen führen Mutationen im *WNT7A-Gen* zu Malformationen der Extremitäten. Das Al-Awadi/Raas-Rothschild/Schinzel-Phokomelie-Syndrom (MIM 276820) ist durch Extremitäten- und/oder Beckenhypoplasie bzw. -aplasie und das Fuhrmann-Syndrom (MIM 228930) durch Fibulaaplasie und/oder -hypoplasie, Femur-Krümmung, Poly-, Syn- und/oder Oligodaktylie bei den Betroffenen gekennzeichnet. Die genetische Ursache dieser Erkrankungen konnte von Woods et al. (2006) aufgeklärt werden, indem zwei unterschiedliche homozygote „Missense“-Mutationen im *WNT7A-Gen* als krankheitsursächlich identifiziert wurden.

Die *Wnt-Gene* wurden in vielen unterschiedlichen Organismen gefunden. Ikegawa und Mitarbeiter (1996) klonierten erstmalig das humane *WNT7A-Gen* und kartierten es auf Chromosom 3p25. In unserem Locus ist *WNT7A* in Richtung der Telomerregion zu finden. Die vier Exons des Gens (NM_004625, GI 34328912) erstrecken sich auf dem genomischen Klon NG_008088 (GI 193082964) über 61,54 Kilobasen. Es kodiert für ein aus 349 Aminosäuren bestehendes Protein mit einer Homologie von 98% zur murinen Form (NP_004616, GI 17505191). Eine Expression des humanen *WNT7A-Gens* wurde in der Plazenta, Nieren, Hoden, Uterus, fetalem Lungengewebe und im fetalen und erwachsenen Gehirn identifiziert.

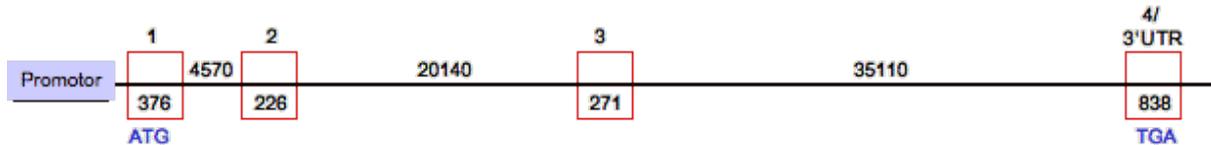


Abb. 3.5: Genomische Struktur von *WNT7A*. Die Größe der 4 Exons sowie der Introns ist in Basenpaaren angegeben. Start- und Stoppkodon liegen auf den Positionen 306 im Exon 1 bzw. 1355 im Exon 4 des kodierenden Klons NM_004625 (GI 34328912).

3.2.2 Mutationsscreening und molekulargenetische Analysen des *WNT7A*-Gens

3.2.2.1 Analyse des *WNT7A*-Gens auf genomischer und cDNA-Ebene

Die vier Exons, einschließlich Promotor- und 3'UTR-Bereiche des *WNT7A*-Gens wurden an genomischer und kodierender DNA amplifiziert. Für die Experimente wurde lymphozytäre und kardiale DNA von Betroffenen sowie lymphozytäre DNA von Kontrollpersonen verwendet. Im Laufe der Untersuchungen fiel auf, dass die Amplifikation von kardialer kodierender DNA weder bei Patienten noch bei Kontrollpersonen gelang. Dies lässt sich auf die fehlende Expression des Gens im adulten Herzen zurückführen.

Die Amplifikation der Promotorregion war aufgrund des hohen Anteils der Nukleinbasen Guanin und Cytosin in der Sequenz problematisch. Letztlich konnte die Region nach sorgfältiger Auswahl von Amplifikationsprimern und Adjustierung der Versuchsbedingungen sequenziert werden. Es wurden dabei keine Auffälligkeiten eruiert.

Im Exon 2 auf Position 541 des kodierenden Klons NM_004625 (GI 34328912) bzw. auf Position 73196 des genomischen Klons RP11-165B2 (GI 13357222) war in einer Patientenprobe eine 1-Basenpaardeletion von Adenin mit konsekutivem „Frameshift“ und Stoppkodon im Exon 4 festzustellen. Weitere Patientenproben waren von dieser Deletion nicht betroffen.

Mittels vergleichender Sequenzanalyse, zwischen Mensch und Maus, wurden stark konservierte Bereiche in den Introns 1, 2 und 3 detektiert. Die Konservierung zwischen verschiedenen Spezies kann auf eine funktionelle Bedeutung der entsprechenden Sequenzen hinweisen. Die Sequenzierung dieser Bereiche an DNA von Betroffenen ergab allerdings keine Auffälligkeiten.

Mehrere Polymorphismen wurden sowohl auf genomischer als auch auf cDNA-Ebene identifiziert. Manche Proben von Betroffenen waren an der Stelle des SNP homozygot für eine Nukleinbase.

Die Amplifikation lymphozytärer cDNA lieferte teilweise keine eindeutigen Ergebnisse, da die auf genomischer Ebene vorhandenen Polymorphismen im Exon 3 bei einigen Patienten auf cDNA-Ebene nicht reproduziert werden konnten.

Die folgende Tabelle 3.3 zeigt eine Auflistung der gefundenen Polymorphismen:

Nukleotidposition	Lokalisation im Gen	Aminosäure	Vergleich mit Datenbank
g.68552 homozygot für A	Intron 1	Keine	nicht bekannt
g.73295 C/A	Intron 2	Keine	nicht bekannt
g.93417 c.620 G/A	Exon 3	Ala105 kein Austausch	bekannt, keine Kosegregation
g.93437 c.640 C/T	Exon 3	Ala112Val A=>V	nicht bekannt
g.93561 c. 764 T/C	Exon 3	Ser153 kein Austausch	bekannt, keine Kosegregation
g.129210 c.1305 G/C	Exon 4	Val334Leu V=>L	nicht bekannt

Tab. 3.3: Einzelnukleotidpolymorphismen im *WNT7A*-Gen. Die Angaben zu den Nukleotidpositionen beziehen sich auf den genomischen Klon RP11-165B2 (GI 13357222) und auf den cDNA-Klon NM_004625 (GI 34328912).

3.2.2.2 Southern Blot des *WNT7A*-Gens

Im Rahmen der Southern-Blot-Analysen des *WNT7A*-Gens wurden alle vier Exons untersucht. Insgesamt wurden für die Hybridisierungen 5 Sonden benutzt. Da die Introns im *WNT7A*-Gen einen großen genomischen Bereich umfassen, musste für jedes der vier Exons und den Promotorbereich eine eigene Sonde hergestellt werden.

Die Hybridisierung von Betroffenen-DNA mit der Sonde von Exon 3 ergab eine zusätzliche, 2,5 kb große Bande. Die Restriktion der DNA war mittels der Endonuklease Kpn I durchgeführt worden. Diese zusätzliche Bande konnte nach Analyse mehrerer Kontroll-DNA-Proben bei einigen reproduziert werden. Dementsprechend wurde ein Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus als Ursache für die zusätzliche Schnittstelle mit der Endonuklease Kpn I und nicht die krankheitsverursachende Mutation angenommen.

Alle weiteren Untersuchungen mit den anderen 4 Sonden erbrachten ein identisches Restriktionsmuster zwischen Kontrollpersonen und Betroffenen.

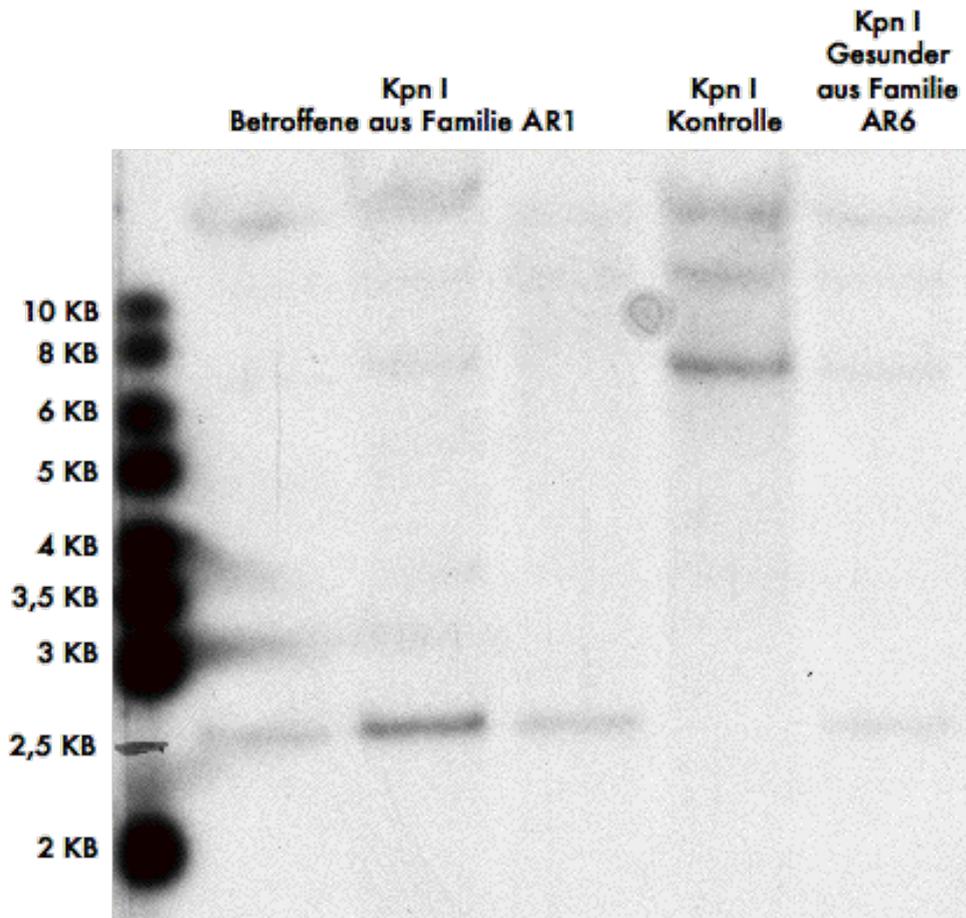


Abb. 3.6: Southern Blot von Exon 3 des *WNT7A*-Gens. In der Abbildung ist bei Betroffenen eine zusätzliche, 2,5 kb große Bande unter Restriktion mit der Endonuklease Kpn I zu sehen. Bei den meisten Kontrollen konnte diese Bande nicht reproduziert werden. In der Abb. sieht man allerdings bei einem nicht Betroffenen aus der Familie AR6 die zusätzliche Bande.

3.3 Das *HDAC11*-Gen (*Histone deacetylase 11-gene*)

3.3.1 Beschreibung und Funktion des *HDAC11*-Gens

Das *HDAC11*-Gen liegt an dem zum Telomer gelegenen Ende des Locus auf Chromosom 3p25.2. Es besteht aus 10 Exons. In dem für die eigenen Untersuchungen verwendeten Klon RP11-449E21 (GI 24796740) befindet sich das Gen zwischen den Positionen 156637 und 181647 und umfasst einen genomischen Bereich von 24074 bp (Voelter-Mahlknecht et al., 2005).

Die menschliche mRNA von *HDAC11* hat eine Länge von 1755 bp (NM_024827.1, GI 13376227) und kodiert für ein Protein, das zur Familie der Histon-Deacetylasen (HDAC) gehört (NP_079103, GI 13376228). Es besteht aus 347 Aminosäuren und hat ein molekulares Gewicht von 39,1 kD. Das *HDAC11*-Protein enthält in den katalytischen

Regionen konservierte Bereiche, die ebenfalls bei anderen eukaryotischen HDAC-Proteinen gefunden wurden. Entsprechende Pendants von *HDAC11* existieren bei Primaten, Pflanzen, Mäusen und *Drosophila* (Gao et al., 2002). Phylogenetische Studien weisen auf einen gemeinsamen Vorläufer dieser Gene und deren weitere Entwicklung während der Evolution hin (Gregoretto et al., 2004).

Die Histon-Deacetylasen spielen eine zentrale Rolle in der Modifikation der Chromatinstruktur und in der Regulation der Zelldifferenzierung und Transkription. Mittels Deacetylierung von Histonproteinen im Zellkern und Bildung von großen regulatorischen Komplexen kann die Transkription von verschiedenen Genen einerseits aktiviert, andererseits supprimiert werden (Nagy et al., 1997, Li et al., 2000). Einige Studien deuten an, dass manche Histon-Deacetylasen ebenfalls mit Nicht-Histon-Proteinen interagieren können (Luo et al., 2000, Marzio et al., 2000, Chen et al., 2001). Basierend auf funktionellen und strukturellen Eigenschaften wurden die Histon-Deacetylasen in vier Gruppen aufgeteilt: Die Klasse I enthält die aus Hefe isolierte Deacetylase RPD3 und deren verwandte Proteine HDAC 1-3 und 8, die Klasse II besteht aus dem Hefeprotein HDA1 und HDAC 4-7 und 9-10, die Klasse III aus dem Hefeprotein SIR2 und verwandten Proteinen und die Klasse IV aus HDAC11 und verwandten Proteinen (Gao et al., 2002, Voelter-Mahlknecht et al., 2005).

Gao et al. (2002) konnten *in vitro* zeigen, dass HDAC11 eine enzymatische Aktivität besitzt, welche durch den HDAC-Inhibitor Trapoxin blockiert werden konnte. Das HDAC11-Protein ist hauptsächlich im Nukleus lokalisiert und interagiert mit HDAC6 *in vivo*. Des Weiteren wurde eine hohe Expression von HDAC11 in verschiedenen Tumorzelllinien gefunden. Dies lässt darauf schließen, dass HDAC11 möglicherweise in der Entwicklung bzw. in der Erhaltung von bestimmten Krebsarten involviert ist. Durch verschiedene HDAC-Inhibitoren konnte in Krebszelllinien eine Suppression des Zellwachstums und eine Apoptoseinduktion herbeigeführt werden (Warrell et al., 1998, Richon et al., 1998, Saunders et al., 1999, Archer and Hodin, 1999, Kutko et al., 2003). In diesem Zusammenhang könnten HDAC-Inhibitoren in Zukunft eine wichtige Rolle bei der medikamentösen Therapie von Krebs einnehmen.

Northern-Blot-Analysen zeigten eine gewebespezifische Expression von HDAC11, die besonders stark im Herzmuskel, Skelettmuskel, Gehirn und den Nieren ausgeprägt ist. Die meisten anderen Mitglieder der HDAC-Familie werden hingegen ubiquitär exprimiert (Yang et al., 1997, Van den Wyngaert et al., 2000).

Darüber hinaus wurden im Northern Blot zwei verschiedene Transkripte von *HDAC11* in menschlichen Geweben gefunden. Das kleinere Transkript hat eine Größe von ca. 1,7 kb und stimmt mit der Länge der menschlichen cDNA überein. Das andere Transkript hat eine Größe von ca. 3,2 kb und wird im Northern Blot stärker exprimiert. Diese beiden Transkripte sind möglicherweise alternative Spleißformen von *HDAC11*. Unklar bleibt, ob das längere Transkript von *HDAC11* enzymatische Aktivität besitzt und ob es in vivo die dominierende Form darstellt.

Histon-Deacetylasen der Klasse II supprimieren normalerweise den zur Expression fetaler kardialer Gene und damit zur Herzhypertrophie führenden MEF2-Transkriptionsfaktor (McKinsey et al., 2002). Unter Stressbedingungen wird eine HDAC-Kinase aktiviert, die zur Phosphorylierung der HDAC-Klasse II-Proteine führt. Dadurch wird die inhibitorische Wirkung der Deacetylasen auf den MEF2-Transkriptionsfaktor aufgehoben. Mutationen im Bereich der Phosphorylierungstellen bewirken, dass die HDAC-Proteine refraktär gegenüber Stresssignalen sind. Dadurch wird eine Hypertrophie der Kardiomyozyten auch unter Stressbedingungen inhibiert. Andererseits sind HDAC9-Knock-out-Mäuse gegenüber Hypertrophie induzierenden Signalen sensibilisiert und entwickeln mit zunehmendem Alter spontan eine stressabhängige Kardiomegalie (Zhang et al., 2002).

In einer Studie von Antos et al. (2003) wurde die Wirkung von nichtselektiven HDAC-Inhibitoren auf Kardiomyozyten unter dem Einfluss von Hypertrophie induzierenden Agonisten untersucht. Unerwartet kam es zu einer dosisabhängigen Blockade der fetalen Genexpression und der Hypertrophie. Dieser Sachverhalt könnte aufgrund unterschiedlicher Rollen der verschiedenen Histon-Deacetylasen in der Genese der Hypertrophie erklärt werden.

Schlussfolgernd könnten Histon-Deacetylasen der Klasse II, HDAC-Inhibitoren und die HDAC-Kinase als Schlüssel für mögliche therapeutische Optionen in der Behandlung der Herzhypertrophie fungieren.

Aufgrund der Beteiligung der HDAC-Proteine in der Entwicklung einer Herzhypertrophie mit konsekutivem Herzversagen und der starken Expression von *HDAC11* im Herzmuskel stellt das *HDAC11*-Gen einen sehr guten Kandidaten in der Erforschung der für die ARVC verantwortlichen Mutation dar.

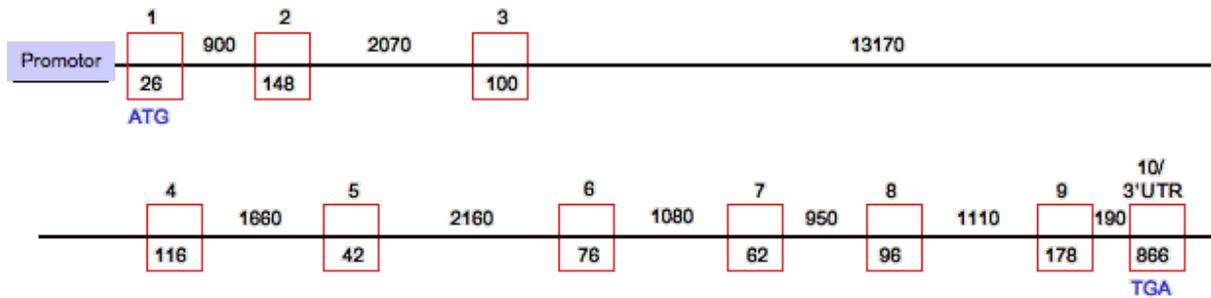


Abb. 3.7: Genomische Struktur des *HDAC11*-Gens. Die Intron- und Exonlängen sowie das Start- (auf Position 25 im Exon 1) und Stoppcodon (auf Position 1068 im Exon 10) sind in der Abbildung eingezeichnet. Die Klone NM_024827.1 (GI 13376227) und RP11-449E21 (GI 24796740) wurden hierfür zugrunde gelegt.

3.3.2 Mutationsscreening und molekulargenetische Analysen des *HDAC11*-Gens

3.3.2.1 Analyse des *HDAC11*-Gens auf genomischer und cDNA-Ebene

Die Analysen wurden an genomischer und kodierender DNA von Betroffenen und Kontrollen durchgeführt. Es erfolgte die Sequenzierung der 10 Exons, der flankierenden Introns sowie Teile des Promotors und der 3'UTR. Der Vergleich der Promotorsequenzen mit der Datenbank erbrachte eine Homologie der Sequenzen zwischen 155290 u. 155505 und zwischen 154590 u. 154690 zu multiplen anderen repetitiven nicht kodierenden Bereiche des genomischen Klons RP11-449E21 (GI 24796740).

In der Promotorsequenz befindet sich ab Position 155211 des genomischen Klons RP11-449E21 ein T-Repeat über 14 Basenpaare. Die Sequenzierung von genomischer DNA einiger Betroffener ergab eine 1-Basen-Insertion von einem zusätzlichen Thymin und anschließender unsauberer Sequenz. Es handelt sich dabei am ehesten um einen Amplifikationsfehler im Rahmen der PCR.

Bei der Untersuchung von Exon 4 und den flankierenden Introns auf genomischer Ebene fiel bei einigen Patientenproben eine unsaubere Sequenz ab Position 173185 im Intron 4 auf. Dies ließ sich auch bei der Sequenzierung mit den entsprechenden „reverse“-Primern reproduzieren. Die Sequenzierung anderer Proben ließ sich entweder aufgrund von Verunreinigungen nicht auswerten oder zeigte keine Auffälligkeiten.

Im Rahmen der Genuntersuchungen an kodierender DNA von Kontrollen und Betroffenen konnten einige Spleißformen identifiziert werden. Die Amplifikation der „forward“-Sequenz ergab in einigen Fällen entweder eine Spleißform ohne Exon 4, 5 und 6 oder eine Doppelsequenz nach Exon 3 (bzw. ab Exon 4). Die Subtraktion dieser Doppelsequenz ergab eine Amplifikation von Exon 4 und 5 auf dem einen Allel und von

Exon 7, 8, 9 und 10 auf dem anderen Allel. Auch in der entsprechenden „reverse“-Sequenz konnte entweder eine Spleißform ohne den Exons 6, 5 und 4 oder eine Doppelsequenz nach Exon 9 (bzw. ab Exon 8) festgestellt werden. Das eine Allel amplifizierte Exon 8 und 7, während das andere Exon 5 und 4 amplifizierte. Ab Exon 3 war erneut eine einheitliche Sequenz zu eruieren. Eine andere Patientenprobe ergab eine Spleißform ohne den Exons 4, 5, 6, 7 und 8.

Insgesamt waren die beschriebenen Doppelsequenzen in den verschiedenen Proben quantitativ unterschiedlich ausgeprägt, so dass manchmal keine Subtraktion der Sequenzen möglich war. Zusammenfassend handelt sich nicht um eine mutationsverdächtige Veränderung, da auch einige Kontrollsequenzen betroffen waren. Andererseits gab es Betroffene, die keine Spleißform aufwiesen.

In der folgenden Tabelle 3.4 sind die von uns identifizierten Polymorphismen im *HDAC11-Gen* aufgeführt:

Nukleotidposition	Lokalisation im Gen	Aminosäure	Vergleich mit Datenbank
g. 155929 C>A	Promotor	keine	nicht bekannt
g. 155960 G>C oder homozygot für C (in Datenbank G)	Promotor	keine	bekannt
g.155984 G>C	Promotor	keine	nicht bekannt
g.156366 C>G	Promotor	keine	nicht bekannt
g.156522 homozygot für G (in Datenbank C)	Promotor	keine	nicht bekannt
g. 156523 homozygot für C (in Datenbank G)	Promotor	keine	nicht bekannt
g.159817	Exon 3	Arg64	nicht bekannt

c.216 G>A		kein Austausch	
g.159831 c.230 A>C	Exon 3	Glu69Ala E => A	nicht bekannt
g.173117 c.345 G>A	Exon 4	Gln107 kein Austausch	bekannt
g.179130 T>C	Intron 7	keine	nicht bekannt
g.179168 C>T	Intron 7	keine	bekannt
g.180477 c.744 G>T	Exon 9	Arg240Ser R => S	nicht bekannt
g.180500 c.767 A>G	Exon 9	Glu248Gly E => G	nicht bekannt
g.180825 c.897 homozygot für T (in Datenbank C)	Exon 10 /3'UTR	Gly291 kein Austausch	nicht bekannt

Tab. 3.4: Einzelnukleotidpolymorphismen im *HDAC11*-Gen. Die angegebenen Nukleotidpositionen basieren auf dem genomischen Klon RP11-449E21 (GI 24796740) bzw. auf die kodierende Sequenz NM_024827.1 (GI 13376227).

3.3.2.2 Southern Blot des *HDAC11*-Gens

Die für das Experiment verwendete cDNA-Sonde umfasste die Exons 2 bis 10. Es wurden Southern Blots von Betroffenen und Kontrollpersonen angefertigt, um einen Vergleich der Restriktionsmuster vornehmen zu können. Mögliche Deletions- und Insertionsmutationen sowie Sequenzunterschiede in den spezifischen Restriktionsstellen sollten dabei detektiert werden. Die Auswertungen ergaben ein identisches Restriktionsmuster der Southern Blots von ARVC-Patienten und Kontrollen.

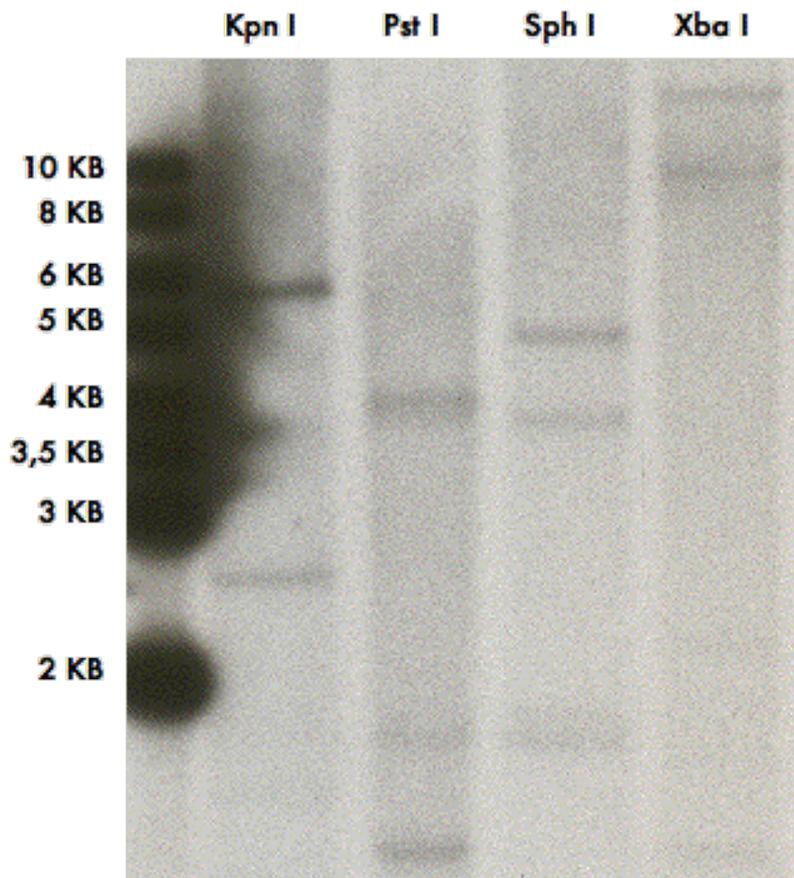


Abb. 3.9: Southern Blot von *HDAC11*. Das Restriktionsmuster von Betroffenen ergab eine Übereinstimmung mit der Datenbank und auch mit Kontrollpersonen.

3.3.2.3 *Untersuchung zur Expression des HDAC11-Gens in verschiedenen menschlichen Geweben (Northern Blot)*

Zur Untersuchung der Expression des *HDAC11-Gens* in verschiedenen menschlichen Geweben wurden Northern Blots angefertigt. Die Intensität einer Bande ist dabei proportional zu der in ihr enthaltenen mRNA-Menge. Die Auswertung der Northern Blots ergab eine starke Expression des *HDAC11-Gens* im Skelettmuskel und Gehirn. Herz, Niere und Pankreas wiesen eine schwächere Expression auf. In der Plazenta, Leber und in der Lunge konnte hingegen eine fast fehlende Expression konstatiert werden. Zusätzlich fiel im Rahmen der Analysen auf, dass in einigen Geweben (Skelettmuskel, Gehirn, Niere, Pankreas) zwei Transkripte exprimiert wurden (1,7 kb bzw. 3,2 kb).

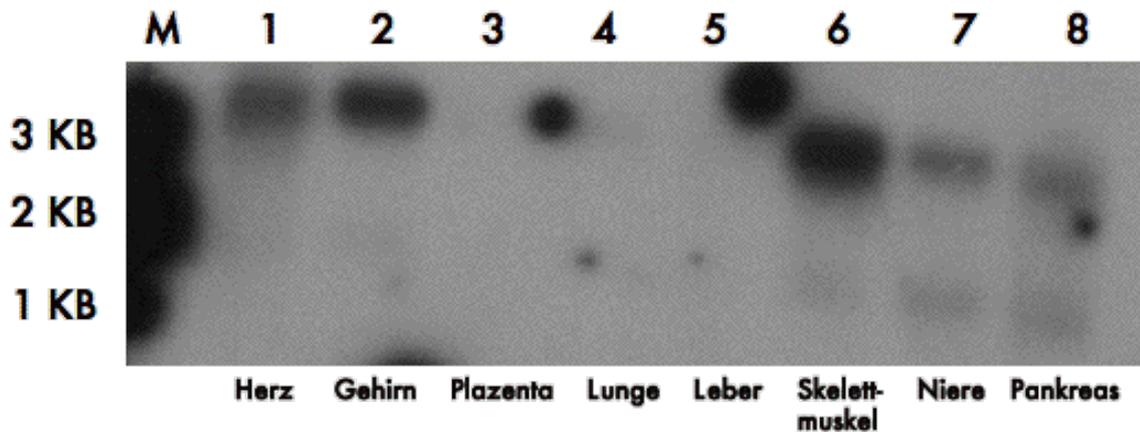


Abb. 3.8: Northern Blot des *HDAC11*-Gens. In der Abbildung können die bereits in der Literatur bekannten Transkripte in einer Größe von 1,7 kb bzw. 3,2 kb gesehen werden. Die größere Transkriptform ist dominant gegenüber der kleineren. Die stärkste Expression ist im Skelettmuskel und Gehirn zu erkennen.

3.4 Das *SLC6A6*-Gen (solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, taurine), member 6)

3.4.1 Beschreibung und Funktion des *SLC6A6*-Gens

Ramamoorthy und Mitarbeiter (1994) konnten durch somatische Zellhybridanalysen und in situ Hybridisierung das *SLC6A6*-Gen auf Chromosom 3p26-p24 lokalisieren. In Zusammenschau anderer Kartierungen befindet sich das Gen auf Chromosom 3p25-p24. Die kodierende DNA besteht aus 6516 Basenpaaren mit 15 Exons (NM_003043, GI 110082729). Das Gen erstreckt sich auf dem genomischen Klon RP11-16L19 (GI 24796718) über ca. 85400 Basenpaare. *SLC6A6* kodiert für ein Protein aus 620 Aminosäuren und einem molekularen Gewicht von 69,699 kDa (NP_003034, GI 54607094). Funktionell handelt es sich um einen Natrium- und Chlorid-abhängigen Taurintransporter (TAUT) mit einem Transportverhältnis von 2:1:1. TAUT gehört zu der Familie von Na- und Cl-gekoppelten Transportern von Aminosäuren, Neurotransmittern und Osmolyten (Chen et al., 2004). Die erste Klonierung eines Taurintransporters gelang Uchida und Mitarbeitern (1992) aus MDCK-Zellen (Madin-Darby Canine Kidney Cells). Durch Northern-Blot-Analysen konnte die Arbeitsgruppe nachweisen, dass die Expression des Taurintransporters in MDCK-Zellen durch Hypertonizität reguliert wird. Im Folgenden wurde die Expression des Taurintransporters in vielen anderen Geweben einschließlich der Skelett- und Herzmuskulatur nachgewiesen (Ramamoorthy et al., 1994).

Für die vorliegende Arbeit waren Untersuchungen des Taurintransporters in Skelett- oder Herzmuskulatur von besonderer Bedeutung. TAUT ist in der Zellmembran und

wahrscheinlich im Sarkoplasmatischen Retikulum lokalisiert. De Luca und Kollegen (1996) konnten zeigen, dass intrazelluläres Taurin an der elektromechanischen Kopplung in gestreifter Muskulatur beteiligt ist. Durch Behandlung mit einem Taurintransporterhemmstoff im Skelettmuskel wurde eine Herabsetzung der Depolarisationsschwelle bewirkt. Sie vermuteten, dass TAUT über eine Interaktion mit Kalziumtransportern an der Kalziumfreisetzung und – aufnahme im Sarkoplasmatischen Retikulum beteiligt ist.

Um den Effekt einer Taurindepletion auf die myokardiale mechanische Funktion zu untersuchen, wurde eine pharmakologische Blockade des Taurintransporters mittel Guanidinesulfonat bei Ratten in vivo durchgeführt. Diese Ratten zeigten im Vergleich zu den Kontrollen eine Reduktion der isometrischen Kontraktionskraft und eine Zunahme der passiven Compliance. Weiterhin konnte eine verminderte Kalziumsensitivität der Muskulatur festgestellt werden (Eley et al., 1994). Lake und Kollegen (1987) fanden bei der Behandlung von Ratten mit dem Taurintransporterhemmstoff Guanidinesulfonat EKG-Veränderungen im Sinne eines Long-QT-Syndroms.

Im Knockoutmodell für den Taurintransporter (*taut^{-/-}*) wurde ein deutlicher Abfall der Taurinkonzentration in verschiedenen Geweben, einschließlich der Herz- und Skelettmuskulatur gemessen. Die TAUT-defizienten Mäuse wiesen einen reduzierten Body-Mass-Index und eine deutlich geringere Ausdauer bei sportlichen Aktivitäten mit erhöhten Lactatspiegeln im Vergleich zu Wildtypmäusen auf. Auch in anderen Organsystemen entwickelten die transgenen Mäuse (*taut^{-/-}*) Funktionsstörungen, wie Verlust der renalen Osmoregulation, visuelle, olfaktorische und auditive Krankheitsentitäten, Leberfibrose und eine veränderte Expression von Neurorezeptoren (Warskulat et al., 2007). Allerdings zeigten die TAUT-Knockoutmäuse in Ruhe und unter Belastung eine weitestgehend normale Herzfunktion. Mittels H1-Magnetresonanzspektroskopie im Herzgewebe wurde festgestellt, dass die Taurindepletion durch Regulation verschiedener anderer organischer Substanzen kompensiert wird (Warskulat et al., 2004).

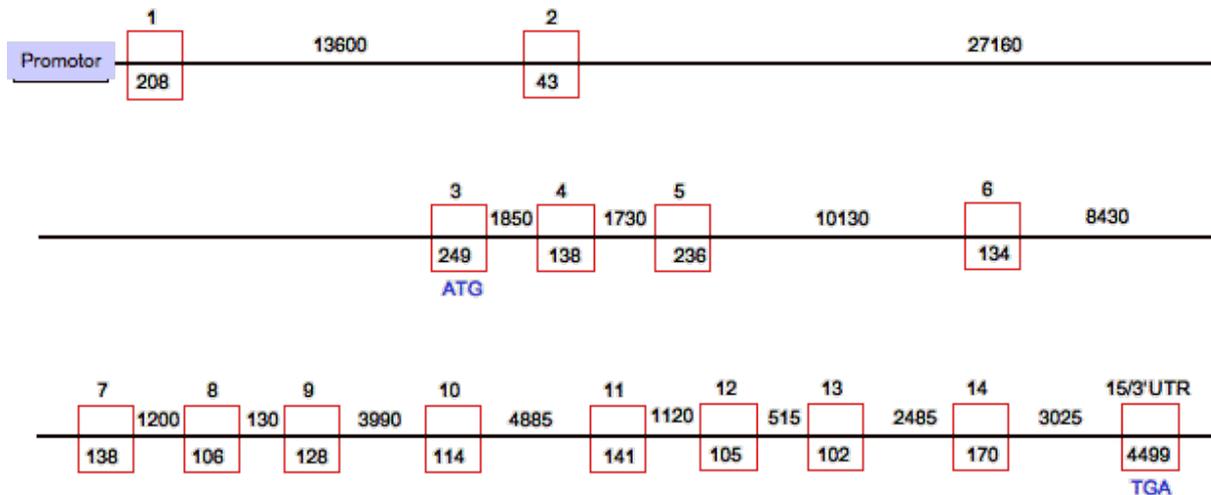


Abb. 3.10: Genomische Struktur des SLC6A6-Gens. In der Abbildung sind die Intron- und Exonlängen sowie das Start- und Stoppkodon auf Position 296 im Exon 3 bzw. auf Position 2158 im Exon 15/3'UTR eingezeichnet (NM_003043, GI 110082729).

3.4.2 Mutationsscreening und molekulargenetische Analysen des SLC6A6-Gens

3.4.2.1 Analyse des SLC6A6-Gens auf genomischer und cDNA-Ebene

Die Sequenzierungen des SLC6A6-Gens erfolgten an lymphozytärer und kardialer DNA. Auf genomischer Ebene wurden zusätzlich zu den Exons und den flankierenden Intronbereichen große Teile der 3'UTR und des Promotors sequenziert. Beim Blasten von Promotorsequenzen waren in der Datenbank Homologien zwischen den Positionen 87700 und 88000 sowie zwischen 86611 u. 86351 des genomischen Klons RP11-16L19 (GI 24796718) zu multiplen anderen nicht kodierenden Bereichen auffällig.

Die Untersuchung von kodierender DNA ergab teilweise die Amplifikation von Intron 8, obwohl per definitionem nicht kodierende Bereiche nicht enthalten sein dürften. An weiteren cDNA-Proben von Patienten und Kontrollen ließ sich dieser Sachverhalt nicht reproduzieren.

Im Exon 15/3'UTR findet man zwischen den Positionen 2865 und 2877 auf dem genomischen Klon RP11-16L19 über 13 Basenpaare einen Poly-A-Stretch. Die Amplifikation dieses Bereiches mit „forward“- und „reverse“-Primern ergab häufig eine Deletion einer Nukleinbase mit anschließender Doppelsequenz. In einigen Fällen waren sogar zwei Adeninbasen deletiert. In Anbetracht der Tatsache, dass sowohl Proben von Patienten als auch von Kontrollen betroffen waren, und die Anzahl der deletierten Basenpaare variierte, handelt es sich hierbei am ehesten um ein PCR-spezifisches Amplifikationsproblem.

Ebenfalls im Exon 15/3'UTR befindet sich ein CA-Repeat zwischen den Basenpaaren 2791 und 2833 auf dem genomischen Klon RP11-16L19. Einige Amplifikationsprodukte wiesen Insertionen von zusätzlichen CA-Repeats mit anschließender Doppelsequenz auf, andere Sequenzen von Patienten waren nicht verändert und schlüssig.

Eine 1-Basen-Deletion auf Position 1402 (RP11-16L19) bzw. 3731 (NM_003043, GI 110082729) im Exon 15/3'UTR konnte bei der Amplifikation von kardialer und lymphozytärer DNA von Betroffenen und Kontrollen nachgewiesen werden (Deletion von einer Nukleinbase Guanin). In einigen Fällen führte die Deletion zur Doppelsequenz, andere Proben waren trotz der Deletion in der Gesamtsequenz unverändert. Die 1-Basen-Deletion ließ sich nicht bei allen Betroffenen wiedergeben, so dass diese Veränderung nicht als mutationsverdächtig zu werten ist.

Die folgende Tabelle 3.5 gibt eine Übersicht über die Polymorphismen, die im Rahmen der eigenen Untersuchungen festgestellt werden konnten.

Nukleotidposition	Lokalisation im Gen	Aminosäure	Vergleich mit Datenbank
g.87535 C>T	Promotor	keine	nicht bekannt
g.87336 C>G	Promotor	keine	bekannt
g. 87145 C>T	Promotor	keine	nicht bekannt
g.85846 homozygot für C (in Datenbank A)	Promotor	keine	nicht bekannt
g.85699 homozygot für C (in Datenbank T)	Promotor	keine	bekannt
g.85112 homozygot für A (in Datenbank C)	Intron 1	keine	nicht bekannt
g.15670 c.1499 homozygot für T	Exon 10	Ser402Cys S => C	nicht bekannt

(in Datenbank A)			
g.10756 c.1526 homozygot für G (in Datenbank A)	Exon 11	Ile411Val I => V	nicht bekannt
g.9478 c.1681 T>C	Exon 12	Ala462 kein Austausch	nicht bekannt
g.9451 c.1708 A>C	Exon 12	Val471 kein Austausch	nicht bekannt
g.9326 T>C	Intron 12	keine	bekannt
g.9204 homozygot für T (in Datenbank A)	Intron 12	keine	nicht bekannt
g.6195 c.1963 G>A	Exon 14	Cys556 kein Austausch	nicht bekannt
g.2952 c.2181 C>T	Exon 15/3'UTR	keine	bekannt
g.2852 c.2281 homozygot für G (in Datenbank C)	Exon 15/3'UTR	keine	nicht bekannt
g.2834 c.2299 homozygot für C (in Datenbank T)	Exon 15/3'UTR	keine	nicht bekannt
g.2667 c.2465 A>C	Exon 15/3'UTR	keine	nicht bekannt
g.2127 c.3006 homozygot für T (in Datenbank C)	Exon 15/3'UTR	keine	bekannt
g.1551 c.3582 G>C	Exon 15/3'UTR	keine	bekannt
g.1486 c.3647 A>G	Exon 15/3'UTR	keine	bekannt
g.1462	Exon 15/3'UTR	keine	bekannt

c.3671 A>G			
g.1234 c.3899 G>A	Exon 15/3'UTR	keine	bekannt
g.1122 c.4011 homozygot für C (in Datenbank T)	Exon 15/3'UTR	keine	nicht bekannt
g.1107 c.4026 homozygot für C (in Datenbank G)	Exon 15/3'UTR	keine	nicht bekannt

Tab. 3.5: Einzelnukleotidpolymorphismen im *SLC6A6*-Gen. Den Auswertungen wurden die Klone RP11-16L19 (GI 24796718) und (NM_003043, GI 110082729) zugrunde gelegt. Die SNP auf den Positionen 1551 (G>C), 1486 (A>G), 1462 (A>G) und 1234 (G>A) des genomischen Klons RP11-16L19 waren in einigen Proben von Betroffenen und Kontrollen jeweils homozygot für die Base, die nicht mit der Sequenz von RP11-16L19 übereinstimmt (rot markiert).

3.4.2.2 Southern Blot des *SLC6A6*-Gens

Für die Southern-Blot-Analysen wurden vier Sonden verwendet, welche die genomischen Bereiche von Promotor, Exon 1, Exon 3 bis 9, Exon 7 bis 15 sowie die 3'UTR umfassten. Der Vergleich der einzelnen Southern Blots zwischen Kontrollpersonen und Patienten ergab eine Übereinstimmung im Bandenmuster.

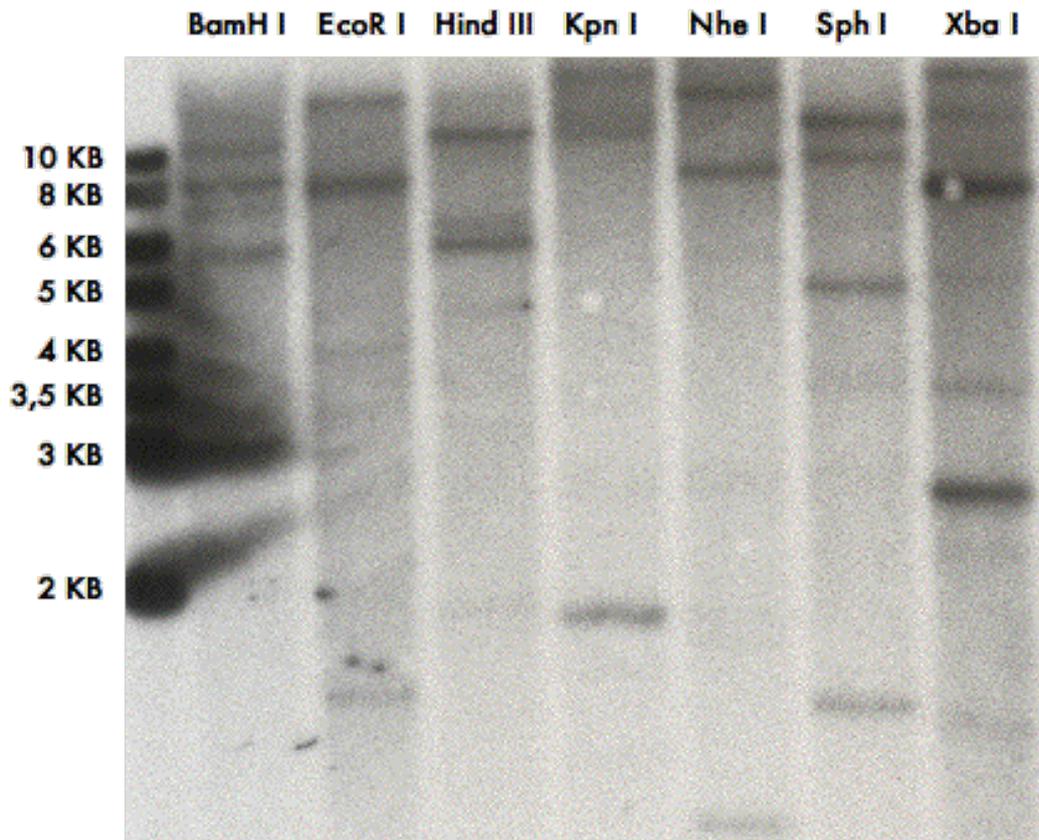


Abb. 3.11: Southern Blot des Promotors und Exon 1 von *SLC6A6*. Das Restriktionsmuster von ARVC-Patienten zeigte eine Kompatibilität mit der Datenbank und Kontrollpersonen.

3.5 Das *GRIP2*-Gen (*glutamate receptor interacting protein 2*)

3.5.1 Beschreibung und Funktion des *GRIP2*-Gens

GRIP wurde erstmalig von Dong et al. (1997) als Interaktionspartner von AMPA-Rezeptoren in Synapsen beschrieben. AMPA-Rezeptoren sind vorwiegend an der exzitatorischen synaptischen Übertragung im zentralen Nervensystem beteiligt. GRIP ist für die Stabilität und Lokalisation des AMPA-Rezeptors an der exzitatorischen Synapse verantwortlich. In vivo Untersuchungen deuteten auf eine spezifische Bindung von GRIP an die GluR2/3-Untereinheiten des Glutamaterezeptors (AMPA) (Wyszynsky et al., 1999). Wyszynski und Mitarbeiter (1999) konnten allerdings zeigen, dass GRIP nicht nur innerhalb exzitatorischer Synapsen, sondern auch in GABAergen Neuronen detektiert werden kann. GRIP1 und 2 bilden eine überschaubare Familie zytoplasmatischer Proteine, welche jeweils aus 7 PDZ-Domänen bestehen. Jede Domäne enthält ca. 80-90 Aminosäuren. Über die PDZ-Domänen binden die GRIP-Proteine am C-terminalen Ende vieler verschiedener Proteine. Beispielsweise sind Interaktionen zu EphrinB1 (Brückner et al., 1999) sowie zu NG2, welches durch unreife Gliazellen exprimiert wird (Stegmüller et al., 2003), beschrieben worden. Zusätzlich

können über die Interaktion zwischen GRIP1 und 2 und die Bildung von Homo- und Heteromultimeren große Proteinkomplexe entstehen. GRIP1 und 2 haben ein Molekulargewicht von ca. 130 kDa und werden vorwiegend im Gehirn exprimiert. Besonders hohe Expressionslevel wurden im Cortex, Hippocampus und Bulbus olfactorius gefunden. Im Gegensatz zu GRIP1 wird GRIP2 relativ spät in der Gehirnentwicklung der Ratte exprimiert (Dong et al., 1999). Die kardiale Expression beider Proteine ist sehr schwach ausgeprägt.

Um die in vivo Funktion von *GRIP1* und *GRIP2* zu beurteilen, wurden die jeweiligen murinen Gene inaktiviert. Die *GRIP1* Knock-out-Maus war durch embryonale Letalität sowie durch eine Störung der Verbindung zwischen Dermis und Epidermis, einhergehend mit ausgeprägter Blasenbildung der Haut, charakterisiert. Die Entität ist dem menschlichen Krankheitsbild der Epidermolysis bullosa ähnlich (Bladt et al., 2002). Offenbar ist GRIP1 für den Zellzusammenhalt, für die Organisation supramolekularer Strukturen und für die embryonale Entwicklung essentiell.

Im Vergleich zeigten GRIP2-defiziente Mäuse einen normalen Phänotyp. Die simultane Ausschaltung von GRIP1 und GRIP2 führte nicht zu einer externen Blasenbildung, sondern zu einem persistierenden Verschluss einer oder beider Augenlider (Takamiya et al., 2004).

Takamiya und Kollegen (2008) untersuchten die Auswirkung eines Knock-outs der *GRIP1*- bzw. *GRIP2*-Gene in murinen Purkinjezellen. Die Ergebnisse deuteten auf eine essentielle Rolle der GRIP-Proteinfamilie in der synaptischen Plastizität des Gehirns.

Das *GRIP2*-Gen liegt an der zum Zentromer gelegenen Seite des Locus. Die 25 Exons der 3426 bp langen kodierenden Sequenz (NM_001080423, GI 122937248) erstrecken sich über 50 kb des genomischen Klons (RP11-588H7, GI 24796745). Das GRIP2-Protein besteht aus insgesamt 1141 Aminosäuren und ist in 7 PDZ-Domänen gegliedert (NP_001073892, GI 122937249).

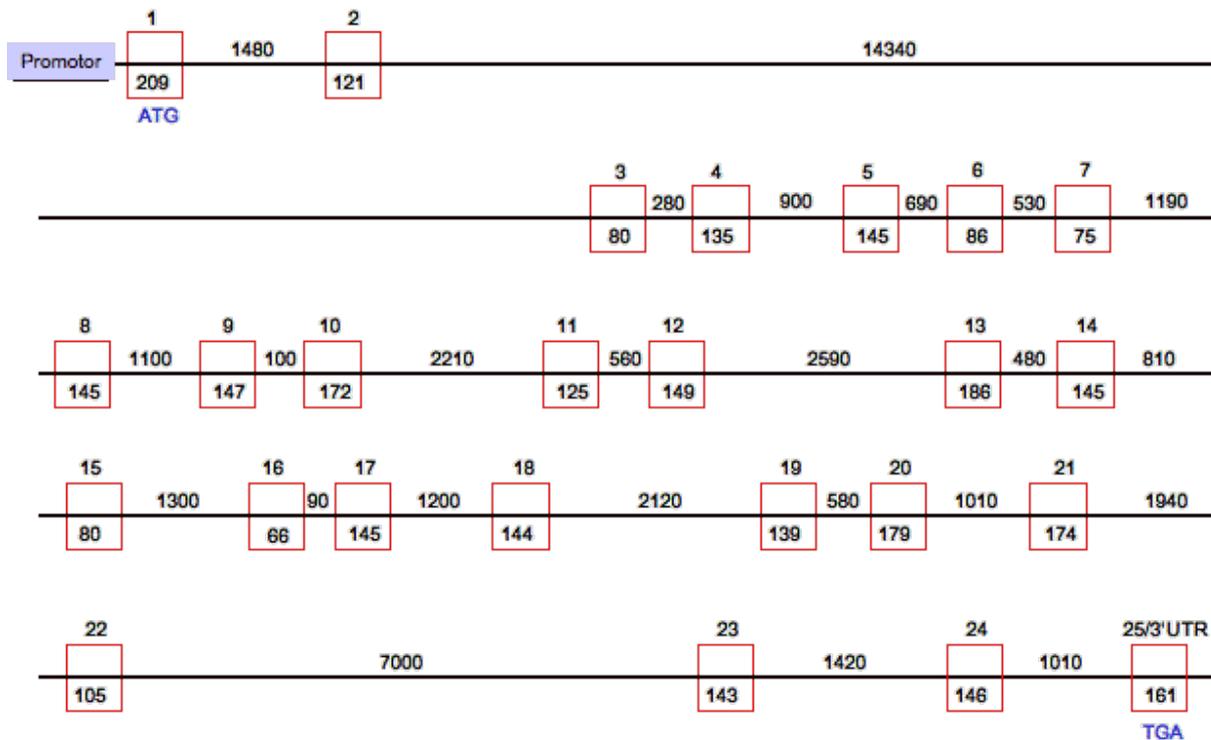


Abb. 3.12: Genomische Struktur von GRIP2. Die Abbildung zeigt die Größe der Introns und der 25 Exons in Basenpaaren. Zusätzlich sind der Beginn und das Ende der Transkription auf Position 1 im Exon 1 bzw. auf Position 3426 im Exon 25 eingezeichnet (NM_001080423, GI 122937248).

3.5.2 Mutationsscreening und molekulargenetische Analysen des GRIP2- Gens

3.5.2.1 Analyse des GRIP2-Gens auf genomischer und cDNA-Ebene

Für die Untersuchungen wurde lymphozytäre und kardiale DNA von Betroffenen verwendet. Zusätzlich erfolgte die Sequenzierung der kodierenden Sequenz an Material von Kontrollpersonen. Dabei konnte eine Spleißform ohne Exon 6 identifiziert werden. Die Analyse der kodierenden DNA von Patienten ergab teilweise einige Bruchpunkte sowie Deletionen. An kardialer cDNA von Betroffenen konnte eine 20 bp-Deletion im Exon 5 ab Position 669 des Klons NM_001080423 (GI 122937248) eruiert werden. Möglicherweise handelt es sich dabei um eine Spleißform. Eine Krankheit verursachende Mutation ist aufgrund der mangelnden Reproduzierbarkeit bei anderen ARVC-Patienten unwahrscheinlich.

Die Auswertung einer cDNA-Probe von Betroffenen zeigte Bruchpunkte im Exon 9 auf Position 1023 bzw. im Exon 17 auf Position 2086 des Klons NM_001080423 (GI 122937248). Die normalerweise zu erwartende Sequenz zwischen beiden Exons fehlte vollständig. Aufgrund der Lokalisation der Bruchpunkte innerhalb der beiden Exons und fehlendem Nachweis dieser Bruchpunkte bei anderen Patienten handelt es sich hierbei am ehesten um eine Amplifikationsverunreinigung im Rahmen der PCR.

Auf genomischer Ebene konnte im Intron 13 auf Position 159716 bzw. im Intron 22 auf Position 177402 des genomischen Klons RP11-588H7 (GI 24796745) jeweils eine 1-bp-Deletion identifiziert werden. Die Prüfung auf Kosegregation zeigte ein negatives Ergebnis. Damit liegen beide Deletionen auf dem gesunden Allel der betroffenen Personen und sind nicht krankheitsrelevant.

Im Rahmen der Experimente erfolgte ergänzend die Sequenzierung der Promotor- und 3'UTR-Regionen. Innerhalb der 3'UTR konnte der Bereich zwischen 181300 und 181700 des genomischen Klons RP11-588H7 trotz ausschöpfender experimenteller Adjustierung nur unsauber amplifiziert werden. Womöglich lässt sich dies durch eine Dominanz der Nukleinbasen Cytosin und Guanin innerhalb dieser Sequenz erklären.

Die Untersuchung des Promotors ergab bis auf einige Polymorphismen keine Auffälligkeiten. Zum Zeitpunkt der Promotoranalysen wurde der kodierende Klon XM_042936 (GI 27478249) zugrunde gelegt. In der aktuellen kodierenden Sequenz NM_001080423 befinden sich Exon 1 und Intron 1 im Bereich der von uns ursprünglich angenommenen Promotorregion. Lediglich wurden demnach ca. 300 bp der nicht kodierenden Sequenz vor Exon 1 untersucht.

Die folgenden Tabellen zeigen eine Auflistung der gefundenen Polymorphismen innerhalb der kodierenden und nicht kodierenden Sequenz des *GRIP2-Gens*. Einige SNP wurden auf Kosegregation mit dem krankheitsverursachenden Allel geprüft. Auf genomischer Ebene waren im Gegensatz zur cDNA meist heterozygote Polymorphismen zu finden. Aufgrund der Homozygotie der SNP auf cDNA-Ebene konnte anhand der Kosegregationsanalysen festgestellt werden, welches der beiden Allele exprimiert wird. Die Polymorphismen in den Exons 13, 14 und 18 zeigten bei der Untersuchung kardialer cDNA eine Expression lediglich des gesunden Allels. Dies könnte auf ein aberrantes Ablesen des krankheitsverursachenden Allels hindeuten. Allerdings ließen sich bei anderen betroffenen Personen in diesen Exons homozygote Polymorphismen mit Expression des krankheitsassoziierten Allels nachweisen.

Nukleotidposition	Lokalisation im Gen	Aminosäure	Vergleich mit Datenbank
g.132489 A/G	Intron 1	keine	bekannt
g.132536 G/A	Intron 1	keine	bekannt
g.132552 T/C	Intron 1	keine	nicht bekannt
g.132690 A/C	Intron 1	keine	nicht bekannt
g.132806 A/G	Intron 1	keine	bekannt
g.147790 A/G	Intron 2	keine	bekannt
g.147809 A/G	Intron 2	keine	bekannt
g.152217 c.894 T/C	Exon 8	Ser298 kein Austausch	bekannt Kosegregation T
g.159664 c.1776 T/C	Exon 13	Ser592 kein Austausch	bekannt Kosegregation T
g.159736 C/T	Intron 13	keine	bekannt Kosegregation C
g.160259 c.1890 A/G	Exon 14	Ala630 kein Austausch	bekannt Kosegregation A
g.160375 G/C	Intron 14	keine	nicht bekannt Kosegregation G
g.162481 A/G	Intron 15	keine	nicht bekannt
g.164031 c.2256 T/C	Exon 18	Ser752 kein Austausch	bekannt Kosegregation T
g.164145 c.2370 G/A	Exon 18	Glu790 kein Austausch	nicht bekannt
g.181716	3'UTR	keine	bekannt

C=>T			
g.183247 C/T	3'UTR	keine	bekannt
g.183450 T=>C	3'UTR	keine	bekannt

Tab. 3.6: Einzelnukleotidpolymorphismen auf genomischer Ebene im *GRIP2*-Gen. Untersuchungen an genomischer DNA. Für die Auswertungen wurden der genomische Klon RP11-588H7 (GI 24796745) und die mRNA-Sequenz NM 001080423 (GI 122937248) zugrunde gelegt. Heterozygoter SNP z.B. G/A. Homozygoter SNP z.B. C=>T (C ist die Base in der Datenbank, T die Nukleinbase in der von uns verwendeten Sequenz).

Nukleotidposition	Lokalisation im Gen	Aminosäure	Vergleich mit Datenbank
g.148503 c.520 A=>G	Exon 4	Asn174Asp N=>D	nicht bekannt
g.148504 c.521 A=>G	Exon 4	Asn174Ser N=>S	nicht bekannt
g.149498 c.617 A=>T	Exon 5	His206Leu H=>L	nicht bekannt
g.150300 c.725 A=>G	Exon 6	Lys242Arg K=>R	nicht bekannt
g.152217 c.894 C=>T	Exon 8	Ser298 kein Austausch	bekannt Kosegregation T
g.159664 c.1776 T=>C	Exon 13	Ser592 kein Austausch	bekannt Kosegregation T
g.160259 c.1890 A=>G	Exon 14	Ala630 kein Austausch	bekannt Kosegregation A
g.162738 c.2163 G=>A	Exon 17	Val721 kein Austausch	nicht bekannt
g.164031 c.2256 homozygot für C oder T	Exon 18	Ser752 kein Austausch	bekannt Kosegregation T

Tab. 3.7: Einzelnukleotidpolymorphismen auf cDNA-Ebene im *GRIP2*-Gen. Untersuchungen an kodierender DNA. Für die Auswertungen wurden der genomische Klon RP11-588H7 (GI 24796745) und die mRNA-Sequenz NM_001080423 (GI 122937248) zugrunde gelegt. Sämtliche Polymorphismen waren auf cDNA-Ebene homozygot. Die erste Base in der Tabelle zeigt die ursprüngliche Nukleinbase in der Datenbanksequenz an. Die zweite Base stellt die von uns bei Betroffenen gefundene Nukleinbase dar.

Konservierte DNA-Abschnitte haben eine hohe Wahrscheinlichkeit, regulative Funktionen auszuüben. Ein Vergleich der humanen, nicht kodierenden Sequenz von *GRIP* mit dem Maus-Genom ergab Homologien zwischen den beiden Spezies in den Introns 1, 4, 9 und 21. Diese Regionen wurden sequenziert, zeigten aber keine genetischen Aberrationen.

3.5.2.2 Southern Blot des *GRIP2*-Gens

Um das gesamte Gen einschließlich Promotorregion zu untersuchen, wurden insgesamt 4 Sonden hergestellt. Bezogen auf den genomischen Klon RP11-588H7 wurde ein Bereich von ca. 50 kb umfasst (zwischen Position 133300 und 180500) und untersucht. Da zum Zeitpunkt der Experimente die mRNA-Sequenz XM_042936 (GI 27478249) als Referenz benutzt wurde, liegt die Promotorregion nach aktuellen Datenbankrecherchen nicht mehr innerhalb des untersuchten Bereichs. Für den Restriktionsverdau wurde genomische sowie kodierende DNA von Patienten und Kontrollen verwendet.

Die Hybridisierung der Sonde F2/R2, welche die Exons 12-19 umspannte, führte mit der Restriktionsendonuklease BamH I zunächst nur bei ARVC-Patienten zu einer zusätzlichen Bande von 4,5 kb. Daraufhin wurde ein Doppelverdau von Kontroll- und Betroffenen-DNA jeweils mit BamH I/EcoR I, BamH I/Hind III und BamH I/Pst I durchgeführt. Die Restriktionsendonukleasen EcoR I, Hind III und Pst I wurden verwendet, da sie in diesem genomischen Bereich viele zusätzliche Schnittstellen besaßen und eine feinere Kartierung erlaubten. Der Doppelverdau ergab zwischen Kontrollen und Betroffenen ein identisches Restriktionsmuster, so dass die zusätzliche Restriktionsstelle mit BamH I durch einen SNP bedingt sein muss (Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus). Letztlich ließ sich die zusätzliche 4,5 kb große Bande auch bei einigen Kontrollpersonen reproduzieren.

Alle weiteren Hybridisierungen zeigten das zu erwartende Restriktionsmuster. Differenzen im Bandenmuster zwischen Kontrollpersonen und Patienten konnte nicht festgestellt werden.

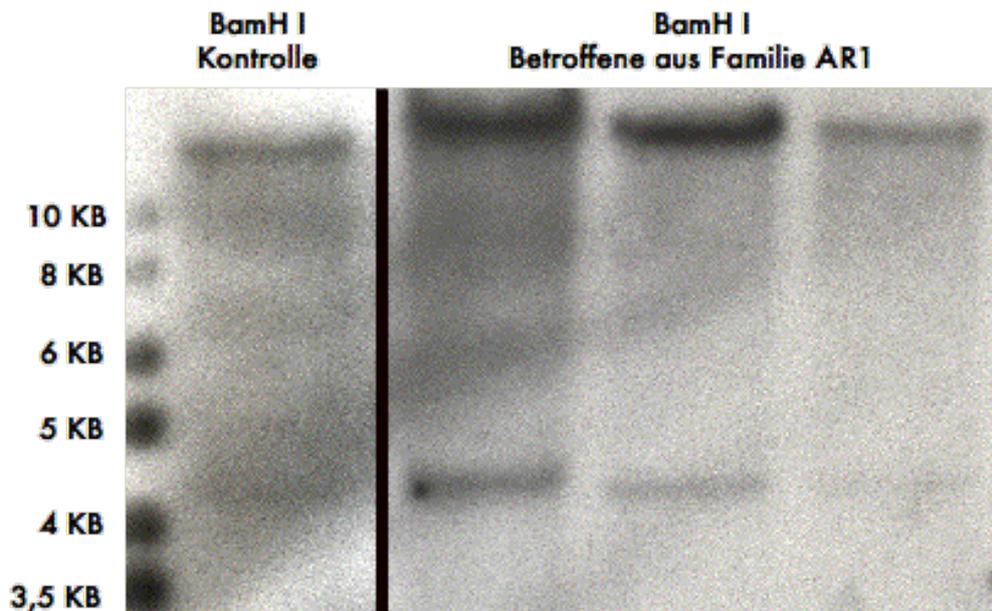


Abb. 3.13: Southern Blot des *GRIP2*-Gens. Im Vergleich zur Datenbank ergab die Restriktion von *GRIP2* im Bereich der Exons 12-19 eine zusätzliche, 4,5 kb große Bande, welche sich schließlich auch bei Kontrollpersonen reproduzieren ließ. Es handelt sich dabei um einen Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus.

3.6 Das *NUP210*-Gen (*nucleoporin 210 kDa, GP210; POM210; FLJ22389; KIAA0906*)

3.6.1 Beschreibung und Funktion des *NUP210*-Gens

Der nukleäre Kernporenkomplex (NPC) moduliert den bidirektionalen Transport von Makromolekülen zwischen dem Zellkern und dem Zytoplasma. Er ist innerhalb der Doppelmembran der Kernhülle lokalisiert. Zudem hat der Porenkomplex über Zytoskelettelemente eine strukturelle Funktion in der Verbindung von Nukleus und Zytoplasma. In der Mitose kommt es zu einem Abbau der Kernmembran und deren Bestandteile, einschließlich des nukleären Kernporenkomplexes. Am Ende der Mitose werden diese Bestandteile erneut für den Aufbau der neuen Kernhüllen der beiden Tochterzellen benutzt. Bodoor et al. (1999) konnten herausfinden, dass das Protein gp210 im Vergleich zu anderen Proteinen erst am Ende der Telophase an der Reassoziierung des Porenkomplexes beteiligt ist.

gp210 bildet einen wichtigen Bestandteil des nukleären Kernporenkomplexes und besteht aus einer kurzen zytoplasmatischen Carboxyl-terminalen Domäne (CTD), einer transmembranösen Domäne sowie aus der annähernd 200 kDa schweren perinukleären N-terminalen Region (Gerace et al., 1982, Wozniak et al., 1989, Greber et al., 1990, Favreau et al., 2001). Es ist ein hochkonserviertes Protein, welches in Wirbeltieren (Gerace et al., 1982), Insekten (Berrios et al., 1995), Nematoden (Cohen et

al., 2003), Protozoen oder in Pflanzen (Mans et al., 2004) nachgewiesen werden konnte. Olsson et al. (1999) fanden mittels in situ Hybridisierung eine bevorzugte Expression von murinem gp210 in Epithelzellen und in Nervengewebe. Hingegen zeigte sich eine verminderte Expression im Herzen. Sowohl bei der Maus als auch beim Menschen existieren jedoch einige Zelltypen, die das gp210-Protein nicht exprimieren (Eriksson et al., 2004, Olsson et al., 2004, Stavru et al., 2006).

Favreau und Mitarbeiter (1996) konnten nachweisen, dass während der Mitose eine spezifische Phosphorylierung des Nukleoporins gp210 am Serinrest auf Position 1880 (Ser1880) erfolgt. Mittels Aminosäuresubstitution wurde gezeigt, dass Serin eine essentielle Rolle in der Stabilisierung des gp210-Proteins innerhalb des Porenkomplexes spielt (Onischenko et al., 2007).

Bezüglich der genauen Funktion des gp210-Proteins finden sich in der Literatur diskrepante Untersuchungen. Im Gegensatz zu den Ergebnissen von Stavru und Kollegen (2006) führte in der Arbeit von Cohen und Mitarbeitern (2003) eine Herunterregulierung von gp210 in HeLa-Zellen zu aberranten Strukturen der Kernmembran sowie zu einer Akkumulation von Nukleoporinkomplexen in den sterbenden Zellen.

Da Porenkomplexe nicht nur innerhalb der Kernmembran, sondern auch in vielen zytoplasmatischen Strukturen enthalten sind, untersuchten Ewald und Mitarbeiter (1996) die Verteilung verschiedener Nukleoporine innerhalb dieser Strukturen. Im Gegensatz zu anderen Proteinen konnten gp210 und POM121 mittels verschiedener spezifischer Antikörper sowie Immunoblot lediglich in der nukleären Region und nicht in den zytoplasmatischen Strukturen nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis deuteten sie dahingehend, dass die beiden Proteine nicht unabdingbar für die Stabilisierung des Porenkomplexes sind, wie zuvor vermutet. Vielmehr dürften sie in Transportprozessen involviert sein.

Das *NUP210-Gen* bildet die zum Telomer des Chromosoms 3 gelegene Locusgrenze. Die 40 Exons umspannen eine genomische Region von ca. 100000 Basenpaaren (RP11-220D14, GI 13384346). Die kodierende Sequenz besteht aus 7191 Basenpaaren (NM_024923, GI 27477133). Das gp210-Protein hat eine molekulare Größe von 210 kDa und enthält 1887 Aminosäuren (NP_079199, GI 27477134).

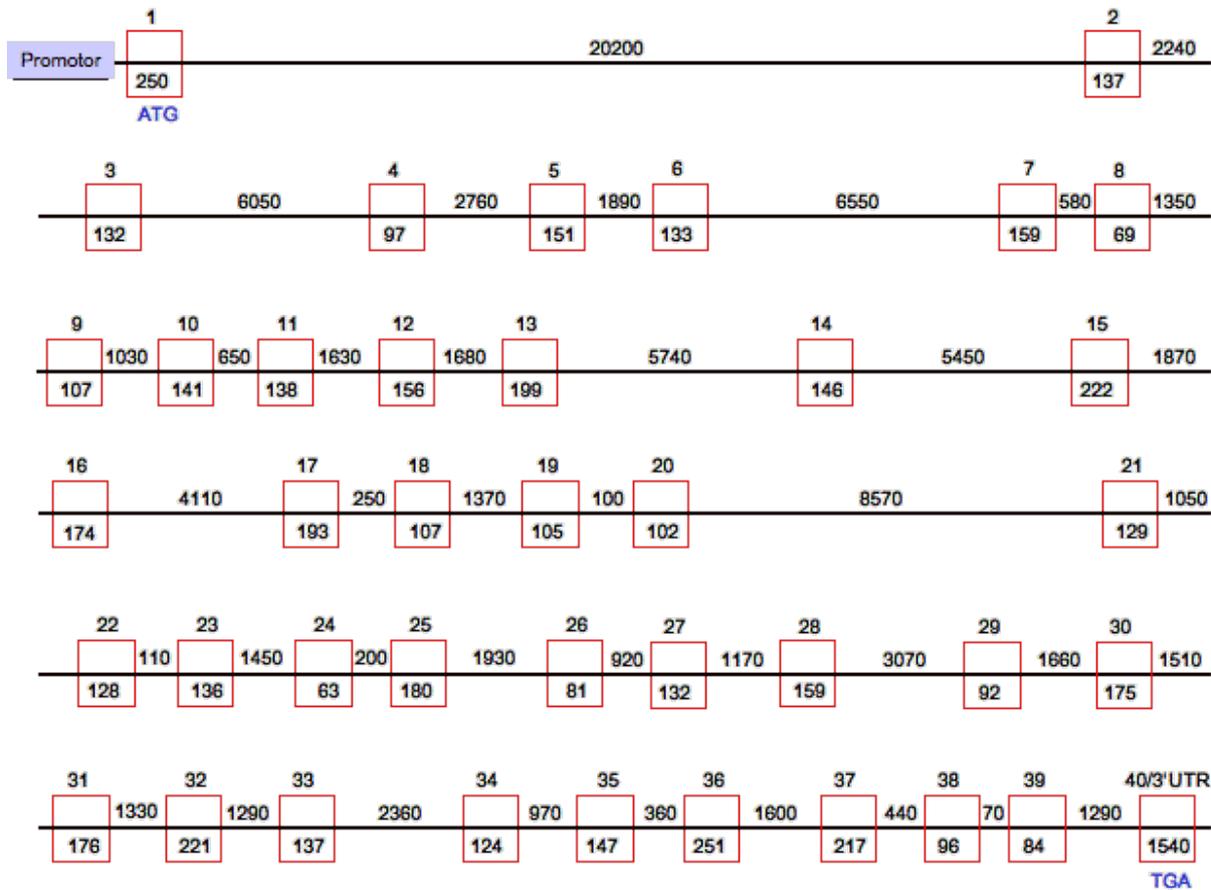


Abb. 3.14: Genomische Struktur von NUP210: Die Exon- und Introngrößen sind in Basenpaaren angegeben. Das Startkodon ATG liegt im Exon 1 auf Position 84, das Stoppkodon TGA im Exon 40 auf Position 5747 des kodierenden Klons NM_024923 (GI 27477133).

3.6.2 Mutationsscreening und molekulargenetische Analysen des NUP210-Gens

3.6.2.1 Analyse des NUP210-Gens auf genomischer und cDNA-Ebene

Die Sequenzierung des NUP210-Gens umfasste die 40 Exons sowie die flankierenden Bereiche der Introns. Zusätzlich wurde ein großer Teil der 3'UTR untersucht.

Bei der Amplifikation der Exons 27 und 28 an genomischer DNA fiel eine Doppelsequenz ab Position 3823 (NM_024923, GI 27477133) bzw. 41835 (RP11-220D14, GI 13384346) im Exon 28 in 5'-Richtung auf. Nach Subtraktion der beiden Sequenzen konnte eruiert werden, dass ein Allel die ursprüngliche Sequenz fortsetzte, währenddessen das andere Allel einen Teil von Exon 27 exprimierte. Die untersuchten Proben stammten sowohl von Betroffenen als auch von Kontrollen, so dass ein methodenspezifischer Fehler nahe liegt.

Eine andere Doppelsequenz konnte ab Position 43040 (GI 13384346) im Intron 27 in beiden Richtungen bei der Amplifikation der Exons 27 und 28 sowie der umgebenden Intronbereiche nachgewiesen werden. Nach Subtraktion der Sequenzen fiel auf, dass

auf dem einen Allel eine Deletion von 10 Basenpaaren in Relation zum anderen Allel zu einer Verschiebung der Sequenz führte.

Am Übergang von Exon 31 zu Exon 30 fiel bei der Amplifikation von kodierender DNA in 5'-Richtung eine Doppelsequenz auf. Das eine Allel exprimierte dabei Exon 30, das andere Exon 29, so dass von einer Spleißform ohne Exon 30 auszugehen ist.

Tabelle 3.8 stellt die Einzelnukleotidpolymorphismen im Bereich der kodierenden Sequenz dar. Diese führten teilweise zu einem Aminosäureaustausch.

Nukleotidposition	Lokalisation im Gen	Aminosäure	Vergleich mit Datenbank
g.85930 c.972 C>T	Exon 7	Ala297Thr A => T	bekannt
g.72336 c.1905 T>C	Exon 14	Ile608Val I => V	bekannt
g. 64514 c. 2399 T>C	Exon 16	Gln772 kein Austausch	nicht bekannt
g.60359 c.2440 C>A	Exon 17	Arg786Leu R => L	bekannt
g.60255 c.2544 G>C	Exon 17	Pro821Ala P => A	bekannt
g.48320 c.3131 A>G	Exon 22	Phe1016 kein Austausch	bekannt
g.46536 c.3354 G>A	Exon 24	Leu1091Phe L => F	nicht bekannt
g.44180 c.3572 C>T	Exon 26	Glu1163 kein Austausch	bekannt
g.33670 c.4415 G>A	Exon 32	Cys1444 kein Austausch	bekannt
g.32182 c.4616 T>C	Exon 33	Ser1511 kein Austausch	bekannt
g.29651 c.4784 G>T	Exon 34	Thr1567 kein Austausch	bekannt
g.26165	Exon 37	Leu1752Ser	bekannt

c.5338 A>G		L => S	
g.26061	Exon 37	Val1787Met	bekannt
c.5442 C>T		V => M	

Tab. 3.8: Einzelnukleotidpolymorphismen an cDNA von *NUP210*. Den Auswertungen wurde der genomische Klon RP11-220D14 (GI 13384346) bzw. die kodierende Sequenz NM_024923 (GI 27477133) zugrunde gelegt. Die beiden SNP in Exon 37 sind nicht heterozygot, sondern homozygot für G (g.26165) bzw. T (g.26061). Alle SNP konnten sowohl auf genomischer als auch auf cDNA-Ebene nachgewiesen werden.

Die Polymorphismen der nicht kodierenden Sequenz (Introns und 3'UTR) im *NUP210*-Gen sind in der folgenden Tabelle 3.9 dargestellt:

Nukleotidposition	Lokalisation im Gen	Aminosäure	Vergleich mit Datenbank
g.103610 G/A	Intron 3	keine	bekannt
g.92814 T/C	Intron 5	keine	bekannt
g. 92778 T/G	Intron 5	keine	bekannt
g.85804 T/C	Intron 7	keine	nicht bekannt
g.85404 A/G	Intron 7	keine	nicht bekannt
g.81684 C/A	Intron 11	keine	nicht bekannt
g.44232 A/G	Intron 25	keine	nicht bekannt
g.33486 T/C	Intron 32	keine	nicht bekannt
g.26012 T/C	Intron 37	keine	nicht bekannt
g.22978 c.6724 A/G	Exon 40/3'UTR	keine	bekannt keine Kosegr.

g.22945 c.6757 G/T	Exon 40/3'UTR	keine	nicht bekannt keine Kosegr.
g.22904 c.6798 T/C	Exon 40/3'UTR	keine	nicht bekannt keine Kosegr.
g.22760 c.6942 A/G	Exon 40/3'UTR	keine	bekannt keine Kosegr.

Tab. 3.9: Einzelnukleotidpolymorphismen an genomischer DNA von *NUP210*. Die Nukleotidpositionen beziehen sich auf den genomischen Klon RP11-220D14 (GI 13384346) und auf die kodierende Sequenz NM_024923 (GI 27477133).

3.6.2.2 Southern Blot des *NUP-210*-Gens

Für die Experimente wurde Kontroll-DNA mittels Endonukleasen restringiert. Dabei wurde nur eine Sonde, welche die Exons 1 bis 8 umfasste, benutzt.

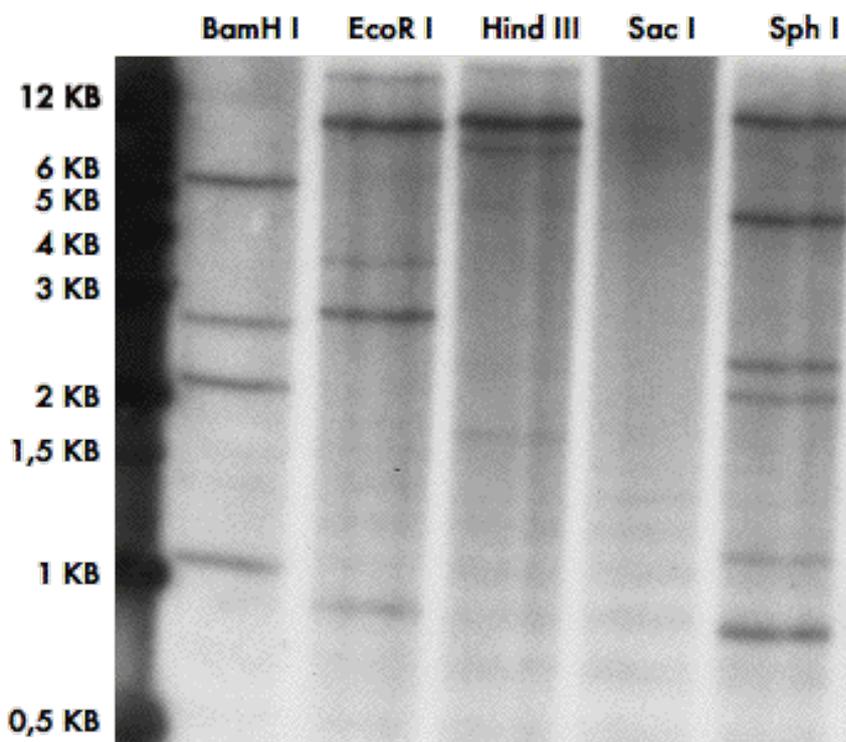


Abb. 3.15: Southern Blot der Exons 1-8 von *NUP210*. Das Restriktionsmuster entsprach dem Muster aus der Datenbank.

3.7 Das *TMEM43*-Gen (*MGC3222*; *DKFZp586G1919*)

3.7.1 Beschreibung und Funktion des *TMEM43*-Gens

Über die Funktion des *TMEM-43*-Gens ist zurzeit wenig bekannt. Nymark et al. (2007) untersuchten asbestexponierte epitheliale und mesenchymale Zelllinien der Lunge.

Dabei wurden einige asbestassoziierte Gene und chromosomale Regionen identifiziert, welche möglicherweise zu einer asbestinduzierten Antwort der Zellen führen. In der Auflistung wurde auch das *TMEM43-Gen* genannt.

TMEM43 ist zwischen den Genen *XPC* und *CHCHD4* auf Chromosom 3p25.1 lokalisiert. Es erstreckt sich auf dem genomischen Klon RP11-320K24 (GI 13378378) über eine Länge von 18634 Basenpaare. Dabei erfolgt das Ablesen der genetischen Information über den Plusstrang. Die entsprechende kodierende Sequenz besteht aus 12 Exons und einer Länge von 3254 Basenpaaren (NM_024334, GI 13236586). Das translatierte Protein umfasst 400 Aminosäuren und hat ein Gewicht von 44876 Da (NP_077310).

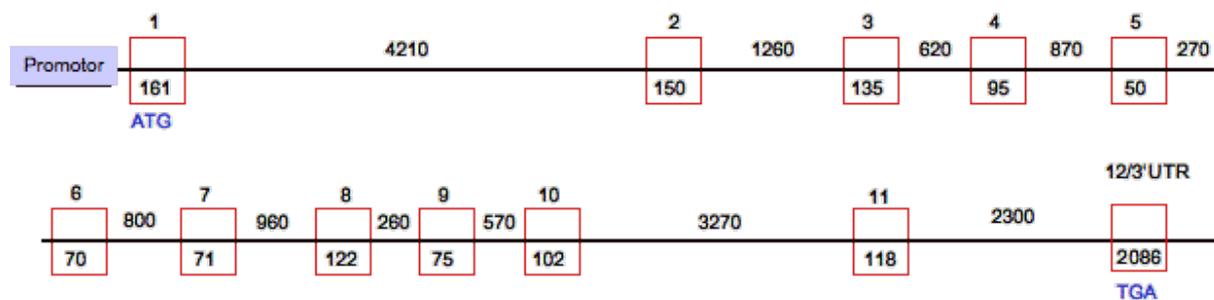


Abb. 3.16: Genomische Struktur des *TMEM43*-Gens. Die kodierende Sequenz hat eine Länge von 3254 bp mit 12 Exons (NM_024334, GI 13236586). Das Startkodon ATG befindet sich auf Position 150 im Exon 1, das Stoppkodon TGA auf der Position 1352 im Exon 12.

3.7.2 Mutationsscreening und molekulargenetische Analysen des *TMEM43*-Gens

3.7.2.1 Analyse des *TMEM43*-Gens auf genomischer und cDNA-Ebene

Zur Sequenzierung des *TMEM43*-Gens wurde genomische und kodierende lymphozytäre DNA von Patienten und Kontrollpersonen verwendet. Ergänzend erfolgten die Experimente an kardialer genomischer DNA eines verstorbenen Betroffenen. Zusätzlich zur Untersuchung der 12 Exons wurden die flankierenden Bereiche der Introns und der Promotorbereich analysiert.

Im Bereich des Introns 1 war bei Betroffenen ein Poly-T-Stretch über 27 Basenpaare auf dem genomischen Klon RP11-320K24 (GI 13378378) zwischen den Positionen 78043 und 78069 zu eruieren. Der Vergleich mit der Datenbank ergab eine Übereinstimmung. Im Gegensatz dazu kam es in unserer Sequenz nach dem Stretch zu einer Doppelsequenz mit Basenrepetitionen. Eine Subtraktion dieser Doppelsequenz war nicht möglich. Die Sequenzierung dieses Bereiches von beiden Seiten ergab dasselbe Ergebnis. Dieses Phänomen ist am ehesten als Amplifikationsproblem im Sinne einer Limitation der PCR und nicht als krankheitsassoziierte Entität zu werten.

Die Sequenzierung von lymphozytärer cDNA eines Patienten ergab eine Spleißform ohne Exon 9, die bei weiteren Betroffenen und Kontrollen nicht bestätigt werden konnte. Die Analyse des Promotors von Betroffenen im Bereich zwischen ca. 83020 u. 82450 auf dem genomischen Klon RP11-320K24 zeigte eine Doppelsequenz, welche nach Subtraktion voneinander und anschließendem Vergleich mit der Datenbank keine Homologie zum *TMEM43-Gen*, sondern eine begrenzte Ähnlichkeit zu Genomabschnitte auf Chromosom 2 und 14 (SLC11A1, RP11-378A13 from 2 und RP5-1021I20 from 14q24.3) zeigte. Die Wiederholung dieser Untersuchung mit identischer genomischer DNA von Betroffenen konnte das Ergebnis nicht bestätigen, so dass auch hier am ehesten von einer Kontamination ausgegangen werden muss.

Im Promotorbereich gab es eine weitere Auffälligkeit. In einer Sequenz von genomischer Patienten-DNA war eine Spleißform festzustellen. Zunächst war der Bereich zwischen 84980 und 85012 amplifiziert worden. Danach folgte direkt ein anderer Abschnitt des Promotors (zwischen 82991 und 83570). Dabei handelt es sich um komplett unterschiedliche Bereiche des Promotors. Die Sequenzierung mittels „forward“-Primer konnte keine Auffälligkeiten nachweisen. Diese Spleißvariante konnte mit genomischer DNA eines anderen Betroffenen nicht reproduziert werden.

Die nachfolgende Tabelle gibt einen Überblick über die Polymorphismen des *TMEM43-Gens*, die anhand der Analyse von genomischer oder kodierender DNA von Betroffenen und Kontrollpersonen eruiert werden konnten:

Nukleotidposition	Lokalisation im Gen	Aminosäure	Vergleich mit Datenbank
g.82200 c.133 C>G	Exon 1	keine	nicht bekannt
g.82191 c.142 homozygot für T (in Datenbank G)	Exon 1	keine	nicht bekannt
g. 74961 G>A	Intron 4	keine	nicht bekannt
g.74899 G>A	Intron 4	keine	nicht bekannt

g.74891 G>A	Intron 4	keine	nicht bekannt
g.74884 A>G	Intron 4	keine	nicht bekannt
g.74804 c.569 G>A	Exon 5	Asn105 kein Austausch	nicht bekannt
g.72213 c.861 homozygot für A (in Datenbank G)	Exon 9	Phe203Leu F => L	nicht bekannt
g.71593 C>T	Intron 9	keine	nicht bekannt
g.71491 c.1009 A>C	Exon 10	Asp252Ala D => A	nicht bekannt
g.71488 c.1012 A>C	Exon 10	Pro253His P => H	nicht bekannt
g.68171 c.1058 C>T	Exon 11	Arg268 kein Austausch	nicht bekannt
g.68156 c.1073 C>T	Exon 11	Ser358Leu S => L	nicht bekannt
g.65772 c.1162 C>T	Exon 12	Ser303Asn S => N	nicht bekannt
g.65107 c.1809 homozygot für G (in Datenbank T)	Exon 12	keine	nicht bekannt
g.64940 c.1994 homozygot für C (in Datenbank T)	Exon 12	keine	nicht bekannt

Tab. 3.10: Einzelnukleotidpolymorphismen von *TMEM43*. Die in der Tabelle angegebenen Basenpaarpositionen beziehen sich auf den genomischen Klon RP11-320K24 (GI 13378378) und dem cDNA-Klon (NM_024334, GI 13236586).

Abb. 3.17 zeigt beispielhaft einen SNP von *TMEM43* im Sequenzchromatogramm:

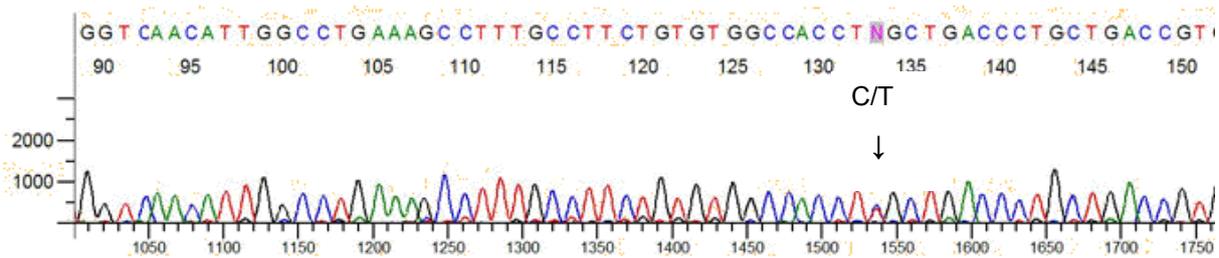


Abb. 3.17: Sequenzchromatogramm. Einzelnucleotidpolymorphismus C/T auf Position 1073 des cDNA-Klons NM_024334 im Exon 11, welcher sich in unseren Untersuchungen sowohl bei Betroffenen als auch bei Kontrollen reproduzieren ließ. Merner und Kollegen (2008) identifizierten diese genetische Aberration als ARVD5 auslösende Mutation (siehe Kapitel IV, 4.5). Nach erneuter Sequenzierung des Exon 11 von *TMEM43* konnten wir das Ergebnis von Merner und Kollegen (2008) bestätigen, so dass es sich initial um einen Vertausch von Proben gehandelt haben muss.

3.7.2.2 Southern Blot des *TMEM43*-Gens

Zur Mutationsanalyse wurden Southern Blots an genomischer DNA von Betroffenen und Kontrollpersonen durchgeführt. Wie in Kapitel II beschrieben, erfolgte zunächst ein Restriktionsverdau der DNA mit Restriktionsendonukleasen. Die Endonukleasen wurden so gewählt, dass sie Schnittstellen im *TMEM43*-Gen bzw. in der unmittelbaren Nähe besitzen. Für dieses Experiment wurden die Endonukleasen EcoR I, Hind III, Sph I, BamH I, Kpn I, Xho I, Xba I, Hpc I, Mlu I, Nhe I, Spe I verwendet. Nach der Restriktion und dem Transfer auf eine Membran wurde die Patienten- bzw. Kontroll-DNA mit der *TMEM43*-Sonde hybridisiert. Die Sonde umfasst Exon 2 bis 11 und wurde aus kodierender DNA hergestellt.

Bei der Ergebnisauswertung wurden einerseits die entsprechende Anzahl der Banden und deren Größe nach Restriktion mit einem bestimmten Enzym mit der Datenbank verglichen. Andererseits konnte das Bandenmuster von Betroffenen und Kontrollpersonen verglichen werden. Das Ergebnis der Autoradiographie zeigte, dass bei Betroffenen und Kontrollen die gleichen Banden detektiert werden konnten. Ergänzend war das Bandenmuster der verschiedenen Restriktionsenzyme identisch mit der Datenbank. Zusammenfassend erbrachte die Southern-Blot-Analyse keinen Hinweis für eine Mutation im *TMEM43*-Gen.

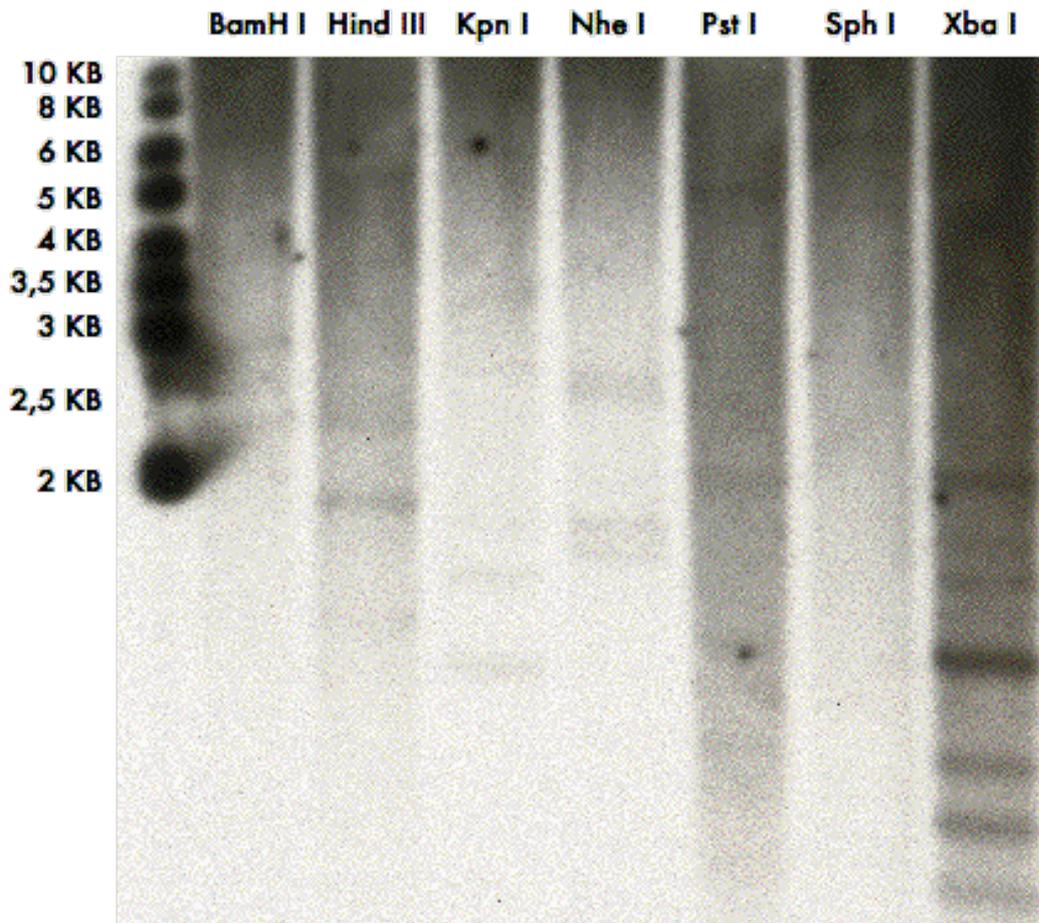


Abb. 3.18: Southern Blot von *TMEM43*. Zwischen Kontrollen und Betroffenen wurde ein identisches Bandenmuster gesehen. Die Southern-Blot-Analyse ergab keinen Hinweis für eine Mutation im *TMEM43-Gen*.

3.8 *Das CHCHD4-Gen (coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain containing 4)*

3.8.1 Beschreibung und Funktion des *CHCHD4-Gens*

CHCHD4 kodiert für ein mitochondriales Protein und gehört zu einer eukaryotischen Genfamilie, die durch die CHCH-Domäne (coiled coil 1)-(helix 1)-(coiled coil 2)-(helix 2) charakterisiert ist. Es handelt sich um eine konservierte Domäne, die auch in Proteinen verschiedener anderer Spezies wie *Drosophila melanogaster*, *Saccharomyces*, Pflanzen, Mäusen und Nematoden nachgewiesen werden konnte.

Jede der α -Helices in der CHCH-Domäne besteht aus 2 Aminosäuren Cystein, die durch neun weitere Aminosäuren getrennt werden. Dieses Motiv wird auch als „CX9C“-Motiv bezeichnet. Zur Strukturstabilisierung werden die beiden Helices durch interhelikale Disulfidbrücken konnektiert (Westerman et al., 2004).

In einigen Arbeiten wurde dem „CX9C“-Motiv eine Funktion beim Import von Proteinen durch die Zellmembran zugemessen. Beispielsweise bildet das CHCHD3-Protein mit

anderen Proteinen einen Komplex an der inneren mitochondrialen Membran (Xie et al., 2007).

Hofmann und Mitarbeiter (2005) konnten nachweisen, dass eine partielle Mutation im Bereich des CX9C-Motivs im *CHCHD4*-Pendant MIA40 bei der Backhefe (*S. cerevisiae*) zu einer Akkumulation von MIA40 im intermembranösen Spalt führt. Hingegen wird durch eine Mutation aller Cysteinresiduen der Transport von MIA40 in das Mitochondrium gehemmt. Immunfluoreszenzfärbungen führten zur Lokalisation von *CHCHD4* im intermembranösen Spalt des Mitochondriums. Im Gegensatz zu seinem Homolog in der Backhefe ist *CHCHD4* nicht in der Membran verankert. Durch RT-PCR-Analysen konnte eine ubiquitäre Expression von *CHCHD4* in menschlichen Geweben nachgewiesen werden, die in Leber, Nieren und Gehirn am stärksten ausgeprägt war. Im Western Blot wurde eine 22 kD große Bande detektiert, die in Leber und Nieren am deutlichsten war, gefolgt von Lunge, Gehirn, Herz und Milz.

CHCHD4 erstreckt sich genomisch mit 4 Exons über einen Bereich von ca. 12800 bp (RP11-14A10, GI 24796714) und liegt auf der genomischen Karte des Locus zwischen *TMEM43* und *LOC255713* (Stand 10/03). Die für die Analysen verwendete kodierende Sequenz hat eine Länge von 1582 Basenpaaren (XM_087417, GI 18555966). Bei NCBI existieren aktuell zwei neue kodierende Sequenzen (Stand 01/08), die sich teilweise von XM_087417 unterscheiden. Die *CHCHD4* Isoform 2 (NM_144636, GI 148612891, 1646 bp), welche insgesamt seltener vorkommt, entspricht fast der von uns verwendeten Sequenz XM_087417. Im Vergleich zur *CHCHD4* Isoform 1 (NM_001098502, GI 148612858, 1476 bp) hat das entsprechende Protein der Transkriptionsvariante 2 einen unterschiedlichen und längeren N-Terminus sowie ein alternatives Segment für die 5'-Region (NP_653237, GI 21389469, 155 Aminosäuren). In experimentellen Studien wurde das Protein der *CHCHD4* Isoform 1 im intermembranösen Raum des Mitochondriums gefunden (NP_001091972, GI 148612859, 142 Aminosäuren).

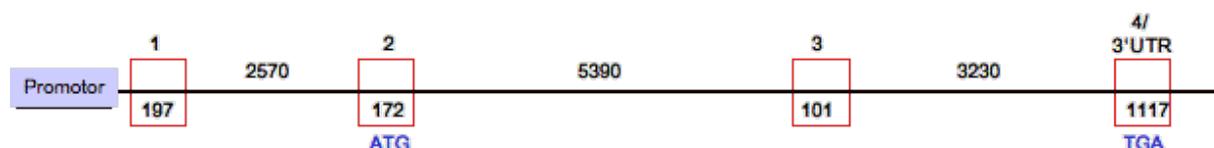


Abb. 3.19: Genomische Struktur des *CHCHD4*-Gens. Für die Untersuchungen wurden der genomische Klon RP11-14A10 (GI 24796714) und die kodierende Sequenz XM_087417 (GI 18555966) zugrunde gelegt. In der Abbildung sind das Startkodon auf Position 306 im Exon 2 und das Stoppkodon auf Position 773 im Exon 4/3'UTR dargestellt. Die entsprechenden Längen von Exons und Introns sind in Basenpaaren angegeben.

3.8.2 Mutationsscreening und molekulargenetische Analysen des *CHCHD4*-Gens

3.8.2.1 Analyse des *CHCHD4*-Gens auf genomischer und cDNA-Ebene

Die Amplifikation des *CHCHD4*-Gens erfolgte an lymphozytärer genomischer und kodierender DNA von Betroffenen und Kontrollen. Zusätzlich wurde postmortal gewonnene kardiale DNA eines Patienten für die Untersuchungen verwendet.

Der Promotorbereich, die 4 Exons einschließlich flankierender Introns und 3'UTR wurden sequenziert. Zusammenfassend konnten keine Auffälligkeiten in der genomischen Struktur festgestellt werden. In der untersuchten Sequenz konnten außerdem keine Polymorphismen nachgewiesen werden.

3.8.2.2 Untersuchung zur Expression des *CHCHD4*-Gens in verschiedenen menschlichen Geweben (Northern Blot)

Die Northern-Blot-Analyse diente dem Nachweis der *CHCHD4*-Expression in verschiedenen Geweben. Der Vergleich mit einigen Kontrollgeweben zeigte, dass die Herz- und Skelettmuskulatur die Hauptexpressionsorte für das *CHCHD4*-Gen darstellen. Dagegen war im Gehirn, Pankreas, in der Lunge und Plazenta kaum eine Genexpression von *CHCHD4* nachzuweisen.

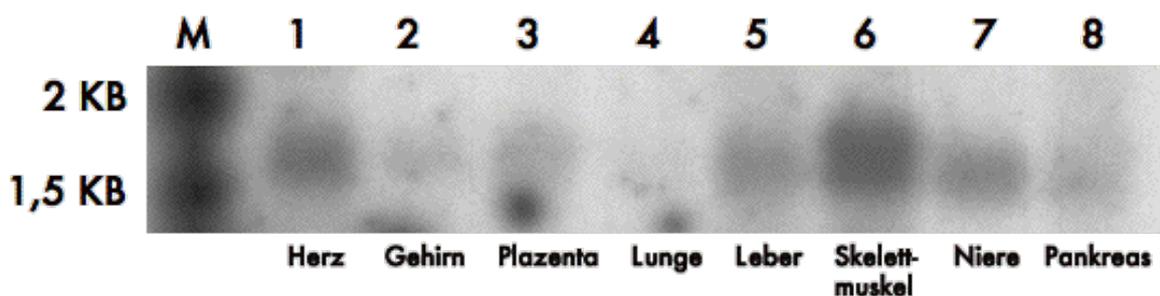


Abb. 3.20: Northern Blot des *CHCHD4*-Gens. Das Herz und der Skelettmuskel stellen die Hauptexpressionsorte für *CHCHD4* dar. In der Abb. kann man das ca. 1,6 kb große Transkript erkennen.

3.8.2.3 Southern Blot des *CHCHD4*-Gens

Für den Restriktionsverdau wurde Kontroll- bzw. Patienten-DNA mit verschiedenen Endonukleasen geschnitten und auf eine Membran transferiert. Die Hybridisierung erfolgte mit einer cDNA-Sonde, welche die Exons 2-4 umfasste. Der Vergleich von Southern Blots von Betroffenen und Kontrollpersonen ergab ein identisches Restriktionsmuster mit gleicher Größe und Anzahl der entsprechenden Banden.

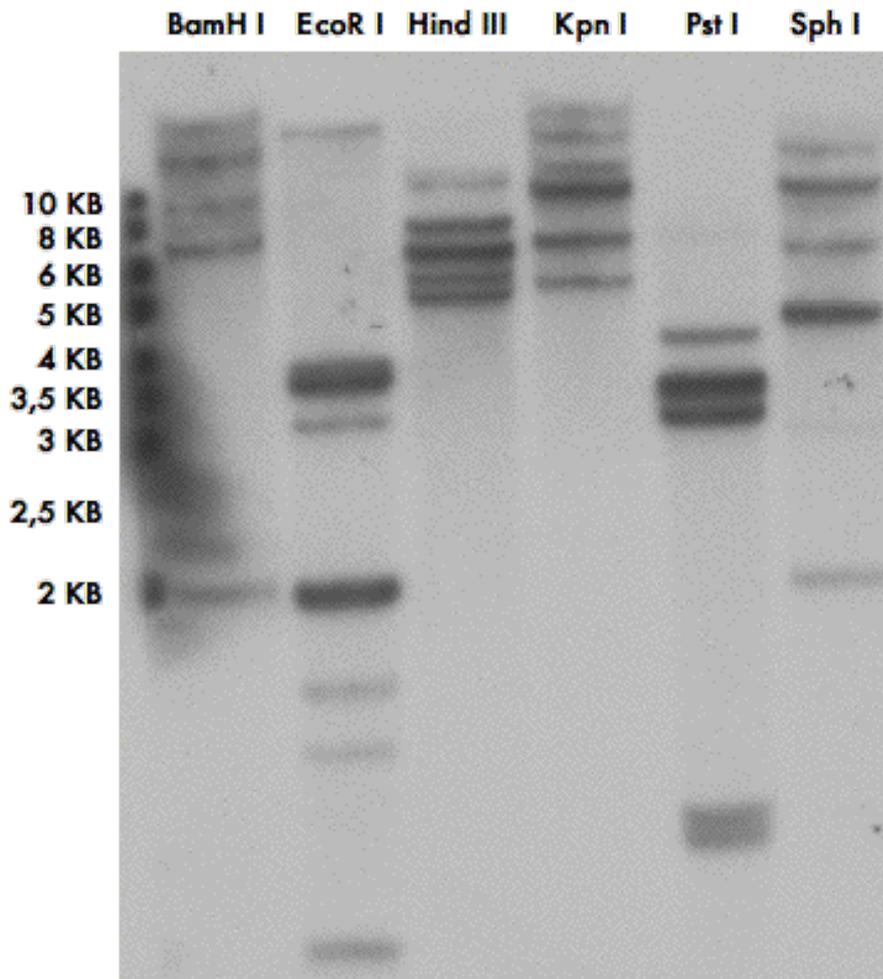


Abb. 3.21: Southern Blot von *CHCHD4*. Die Autoradiographie zeigte ein identisches Restriktionsmuster zwischen Kontrollen und ARVC-Patienten. In der Abbildung ist die Restriktion eines Betroffenen mit den Endonukleasen BamH I, EcoR I, Hind III, Kpn I, Pst I und Sph I zu sehen.

3.9 *Das TPRXL-Gen (tetra-peptide repeat homeobox-like)*

3.9.1 Beschreibung und Funktion des *TPRXL-Gens*

Das *TPRXL-Gen* ist ein Pseudogen, das zur Familie der TPRX-Homeobox-Gene gehört. Pseudogene sind dadurch charakterisiert, dass sie in der Struktur Genen ähneln, ohne für ein funktionelles Protein zu kodieren. Sie entstehen meist durch eine Genduplikation und gelten als funktionslose Duplikate funktionierender Gene. Das *TPRXL-Pseudogen* besteht aus 3 Exons und einem kodierenden Bereich von 2182 Basenpaaren (NR_002223.2, GI 142384747) und befindet sich auf dem genomischen Klon RP11-320K24 (GI 13378378) zwischen den Positionen 144000 und 141398.

Die Homeobox-Gene sind an der frühen embryonalen Entwicklung beteiligt und haben eine regulative Funktion. Ein bestimmter Bereich von 180 Basenpaaren, die Homeobox, ist diesen Genen gemeinsam. Die Homeobox kodiert für die Homeodomäne, welche

aus 60 bis 63 Aminosäuren besteht. Dieser Proteinabschnitt interagiert mit bestimmten DNA-Bereichen nachgeschalteter Gene (Booth und Holland, 2007). Da den Homeobox-Genen als Regulatoren von Transkriptionsvorgängen eine besondere Schlüsselstellung zugesprochen wird, scheint es aus evolutionsbiologischer Sicht sinnvoll, durch Genduplikation „Sicherheitskopien“ im Genom in Form von Pseudogenen zu speichern.

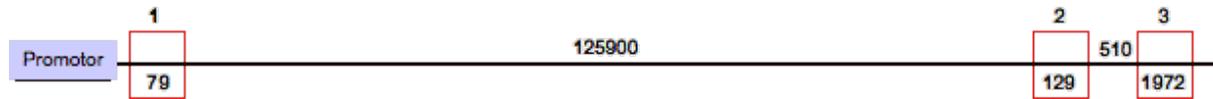


Abb. 3.22: Genomische Struktur von *TPRXL*. In der Abbildung sind die 3 Exons von *TPRXL* mit den dazu gehörigen Introns eingezeichnet. Die Größen sind in Basenpaaren angegeben. Start- und Stoppkodon existieren aufgrund der Entität als Pseudogen nicht.

3.9.2 Mutationsscreening und molekulargenetische Analysen des *TPRXL*-Gens

3.9.2.1 Analyse des *TPRXL*-Gens auf genomischer und cDNA-Ebene

Die Analysen des Gens erfolgten an lymphozytärer genomischer und kodierender DNA. Im Rahmen der Auswertung von Sequenzierungsergebnissen war ein Bereich von 32 Basenpaaren auffällig (GI 142384747, zwischen den Positionen 411 und 443), der vielen Homeoboxproteinen unterschiedlicher Spezies gemeinsam ist. Es handelt sich hierbei offensichtlich um einen konservierten Bereich innerhalb des Genoms.

Wie die nachstehende Tabelle 3.11 zeigt, konnten bei der Sequenzierung mittels genomischer DNA folgende Polymorphismen in Exon 3 eruiert werden:

Nukleotidposition	Lokalisation im Gen	Aminosäure	Vergleich mit Datenbank
g.142935 c.627 C>G	Exon 3	keine	nicht bekannt
g.142914 c.648 C>G	Exon 3	keine	nicht bekannt
g.142839 c.726 C>G	Exon 3	keine	nicht bekannt
g.142785 c.780 C>G	Exon 3	keine	nicht bekannt
g.142752 c.813 C>G	Exon 3	keine	nicht bekannt

g.142702 c.863 C>A	Exon 3	keine	nicht bekannt
-----------------------	--------	-------	---------------

Tab. 3.11: Einzelnukleotidpolymorphismen an genomischer DNA von *TPRXL*. Die Nukleotidpositionen der SNP beziehen sich auf die Sequenzen des genomischen Klons NT 022517.17 (GI 51464027) und der mRNA NR_002223.2 (GI 142384747).

Die Sequenzierung an komplementärer DNA ergab folgende SNP:

Nukleotidposition	Lokalisation im Gen	Aminosäure	Vergleich mit Datenbank
g.142980 c.582 C>A	Exon 3	keine	nicht bekannt
g.142951 c.611 T>A	Exon 3	keine	nicht bekannt
g.142947 c.615 C>G	Exon 3	keine	nicht bekannt
g.142939 c.623 T>C	Exon 3	keine	nicht bekannt
g.142935 c.627 C>G	Exon 3	keine	nicht bekannt
g.142934 c.628 C>T	Exon 3	keine	nicht bekannt
g.142927 c.635 C>T	Exon 3	keine	nicht bekannt
g.142925 c.637 C>T	Exon 3	keine	nicht bekannt
g.142922 c.640 C>T	Exon 3	keine	nicht bekannt
g.142874 c.691 C>T	Exon 3	keine	nicht bekannt
g.142622 c.943 C>T	Exon 3	keine	nicht bekannt
g.142619 c.946 C>T	Exon 3	keine	nicht bekannt

g.142592 c.973 C>T	Exon 3	keine	nicht bekannt
g.142577 c.988 C>T	Exon 3	keine	nicht bekannt

Tab. 3.12: SNP des *TPRXL*-Gens auf cDNA-Ebene.

3.10 Das *LSM3*-Gen (*Sm-like-3-gene*)

3.10.1 Beschreibung und Funktion des *LSM3*-Gens

LSM3 kodiert für das Lsm3-Protein, das zu einer Gruppe hochkonservierter Proteine gehört. Basierend auf Sequenzhomologien zur Sm-Proteinfamilie wurden die Sm-ähnlichen Proteine sowohl in eukaryotischen Organismen als auch in Bakterien nachgewiesen. Sie enthalten eine Sm-Domäne, die erstmals für die Sm-Proteine beschrieben wurde (Salgado-Garrido et al., 1999). Das Sm-Motiv ermöglicht wahrscheinlich Interaktionen zwischen den Proteinen und die Bildung einer stabilen Heptamerstruktur. Achsel et al. (1999) zeigten, dass das Lsm-Heptamer spezifisch an die U6 snRNA (small nuclear RNA) der Zelle bindet. Diese spezifische Bindung konnte besonders für die Proteine Lsm3 und Lsm4 bestätigt werden (Salgado-Garrido et al., 1999). snRNAs sind für das Spleißen der Introns von prä-mRNA zu mRNA verantwortlich und kommen in Assoziation mit Proteinen in snRNP-Komplexen („small nuclear ribonucleoprotein“) vor. Lsm-Proteine sind möglicherweise an der Bildung des U4/U6 snRNP-Komplexes beteiligt.

Bedingt durch eine Destabilisierung des U6 snRNA-Komplexes führen Mutationen in den Genen *LSM2-8* bei der Hefe zu einem Spleißdefekt (Salgado-Garrido et al., 1999). Des Weiteren scheinen die Lsm-Proteine am mRNA-Abbau, vor allem am „decapping“ beteiligt zu sein. Mutationen der Gene *LSM2*, *LSM3*, *LSM4* und *LSM5* oder Deletionen von *LSM1*, *LSM6* und *LSM7* führen zu einer verminderten mRNA-Abbaurrate (Tharun et al., 2000). Es gibt Hinweise darauf, dass humane Lsm-Proteine einen ähnlichen Komplex bilden, der auch bei der Hefe gefunden werden konnte, und das nötige Werkzeug für die mRNA-Degradation besitzen (Ingelfinger et al., 2002). Lsm-Proteine sind also nicht nur im prä-mRNA-Spleißen, sondern auch im mRNA-Abbau involviert.

Das *LSM3*-Gen umspannt auf genomischer Ebene eine Sequenzlänge von ca. 19,5 kb und liegt auf dem genomischen Klon RP11-320K24 (GI 13378378) zwischen den Positionen 28540 und 9042. Der kodierende Bereich besteht aus 4 Exons mit einer

Gesamtlänge von 579 bp (NM_014463, GI 7657314). Das Produkt ist ein aus 102 Aminosäuren bestehendes Protein (NP_055278, GI 7657315).



Abb. 3.23: Genomische Struktur des *LSM3*-Gens. Der kodierende Bereich des Gens, der sich aus 4 Exons zusammensetzt, umfasst 579bp (NM_014463, GI 7657314). Das Start – bzw. Stoppcodon befinden sich im Exon 1 auf Position 30 bzw. im Exon 4 auf Position 338 (GI 7657314). Die Exonlängen und die ungefähren Introngrößen sind in Basenpaare angegeben.

3.10.2 Mutationsscreening und molekulargenetische Analysen des *LSM3*-Gens

3.10.2.1 Analyse des *LSM3*-Gens auf genomischer und cDNA-Ebene

Die Sequenzierung des *LSM3*-Gens von betroffenen Personen ergab keine Auffälligkeiten. Die Untersuchungen wurden an genomischer und komplementärer DNA (cDNA) durchgeführt, welche aus Lymphozyten und Kardiomyozyten gewonnen wurden. Weiterhin konnten weder bei Patienten noch bei Kontrollen SNP nachgewiesen werden. Von besonderer Bedeutung ist der Vergleich der Polymorphismen auf genomischer bzw. cDNA-Ebene. Ein genomischer SNP, der nicht in der komplementären DNA nachweisbar ist, könnte auf eine fehlende Expression des einen Allels zurückgeführt werden, die wiederum durch eine Mutation bedingt sein kann. Im Falle des *LSM3*-Gens sind innerhalb der kodierenden Sequenz weder auf genomischer noch auf cDNA-Ebene SNP gefunden worden, so dass sich aus diesen Ergebnissen kein Anhalt für eine Irregularität der Expression und damit einer potentiellen krankheitsauslösenden Mutation ergibt.

3.11 *Das XPC-Gen (Xeroderma pigmentosum, complementation group C)*

3.11.1 Beschreibung und Funktion des *XPC*-Gens

Xeroderma pigmentosum ist eine sehr seltene, autosomal-rezessiv vererbte Erkrankung, die bei den Betroffenen bereits in frühesten Kindheit zur Ausbildung zahlreicher, meist bösartiger Hauttumoren an sonnenexponierten Körperstellen führt. Das Hautkrebsrisiko ist um ein tausendfaches höher als in der Normalbevölkerung (Kraemer et al., 1994). Die erhöhte Sensitivität gegenüber UV-Licht entsteht durch die Unfähigkeit, UV-induzierte DNA-Schäden zu reparieren (van Steeg und Kraemer, 1999).

Nach dem heutigen Stand der Forschung gibt es sieben DNA-Reparaturgene XP A-G, welche bei der Nukleotidexzisionsreparatur (NER) eine Rolle spielen. Ein Defekt eines dieser Gene führt zur verminderten DNA-Reparaturfähigkeit und zum klinischen Bild der Xeroderma pigmentosum.

Das *XPC-Gen* befindet sich auf dem genomischen Klon AY131066 (GI 21914793) zwischen den Basenpaarpositionen 960 und 34300. Es besteht aus 16 Exons, welche einen kodierenden Bereich von 3714 Basenpaaren umfassen (NM 004628.3, GI 54607142). Das XPC-Protein hat eine Sequenzlänge von 940 Aminosäuren (NP_004619.2, GI 20127460).

XPC ist spezifisch an der Reparatur nicht transkribierter DNA beteiligt. Folglich können Mutationen im *XPC-Gen* zu einem Defekt der DNA-Reparaturfähigkeit führen.

Masutani und Mitarbeiter (1994) konnten zeigen, dass XPC einen Komplex mit dem HHR23B-Protein bildet, der zur Initiierung der Nukleotidexzisionsreparatur führt (Sugasawa et al., 1998). Der XPC–HHR23B-Komplex erkennt den Defekt innerhalb der DNA, bindet an diesen und führt zur Aktivierung aller weiterer NER-Faktoren (Volker et al., 2001).

Sands und Mitarbeiter (1995) untersuchten Mäuse, bei denen das *XPC-Gen* ausgeschaltet wurde und stellten fest, dass diese Mäuse im Vergleich zu heterozygoten bzw. Wildtypmäusen eine sehr hohe Suszeptibilität gegenüber UV-induzierter Karzinogenese aufweisen.

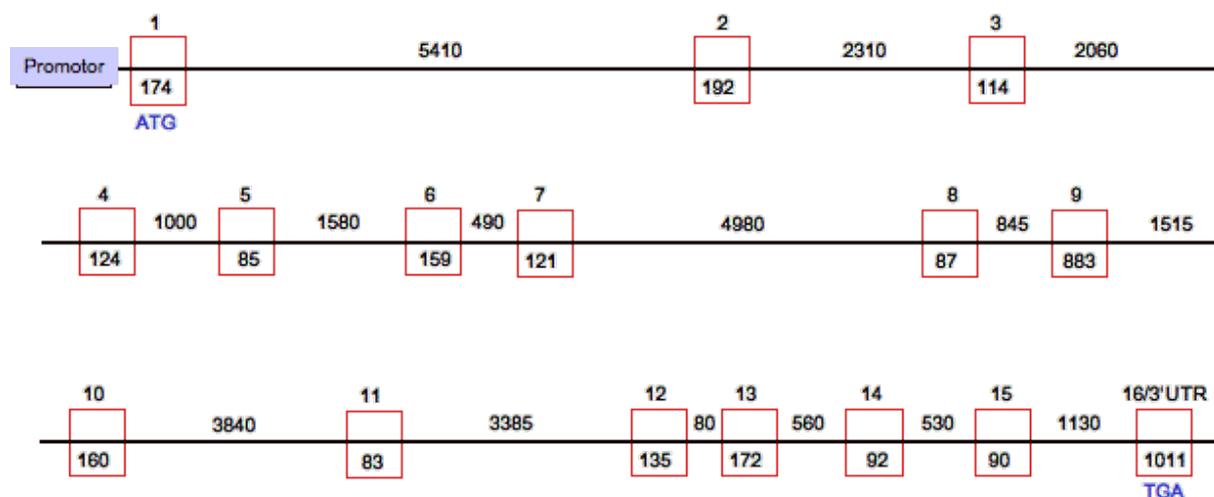


Abb. 3.24: Genomische Struktur von XPC. Die Länge der 16 Exons und der Introns ist in Basenpaaren angegeben. Das Startkodon ATG liegt im Exon 1 auf Position 72, das Stoppkodon TGA im Exon 16 auf Position 2894 des Klons NM 004628.3 (GI 54607142).

3.11.2 Mutationsscreening und molekulargenetische Analysen des *XPC-Gens*

3.11.2.1 Analyse des *XPC-Gens* auf cDNA-Ebene

Die genetischen Analysen am *XPC-Gen* erfolgten mittels komplementärer Lymphozyten-DNA bei Betroffenen und Kontrollpersonen.

In der „forward“-Sequenz eines betroffenen Patienten zeigte sich eine Doppelsequenz direkt nach Exon 3. Die zugehörige „reverse“-Sequenz wies entsprechend nach Exon 6 (d.h. vor Beginn des Exon 5) eine Doppelsequenz auf. Es könnte sich dabei um eine alternative Spleißform ohne Exon 4 und 5 handeln. Die Sequenzierung von cDNA weiterer betroffener Personen war in diesem Bereich unauffällig.

Im Rahmen der Sequenzanalyse konnte ein SNP in Exon 16 vor dem Stoppkodon bei einigen Betroffenen festgestellt werden. Die Kontroll-cDNA war an dieser Stelle homozygot für die Base Cytosin.

Nukleotidposition	Lokalisation im Gen	Aminosäure	Vergleich mit Datenbank
g.33512 C>A c.2886 C>A	Exon 16	Lys939Gln K => Q	bekannt

Tab. 3.13: SNP im *XPC-Gen*. Die Nukleotidpositionen des SNP beziehen sich auf die Sequenzen des genomischen Klons AY131066.1 (GI 21914793) und der mRNA NM 004628.3 (GI 54607142).

In der 3`UTR von einigen ARVC-Patienten war in der „reverse“-Sequenz zwischen den Positionen 3150 und 3111 (NM 004628.3) eine Doppelsequenz zu eruieren. Aufgrund der unsauberen Sequenz an dieser Stelle konnten die Sequenzen nicht voneinander subtrahiert werden. Nach der Doppelsequenz war das entsprechende PCR-Produkt schlüssig ohne Auswirkungen auf die folgende Sequenz. Auch die „forward“-Sequenz war unauffällig. Es handelt sich dabei am ehesten um ein PCR-Artefakt.

3.12 Das *C3orf19-Gen* (*chromosome 3 open reading frame 19; Hematopoietic stem/progenitor cells-gene, HSPC212; FLJ33839*)

3.12.1 Beschreibung und Funktion des *C3orf19-Gens*

Das *C3orf19-Gen* wurde erstmals im Rahmen einer Analyse von 300 cDNAs aus CD34+ hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen beschrieben. Eine Expression des Gens wurde in den hämatopoetischen Zelllinien K56 und U937 gefunden (Zhang et al., 2000).

In unserem Locus befindet sich das Gen an der zum Zentromer gelegenen Grenze und ist auf dem genomischen Klon RP11-708D1 (GI 13384361) zwischen 16709 und 37620 lokalisiert. Das *C3orf19-Gen* umfasst somit auf genomischer Ebene einen Bereich von ca. 21 kb.

Es existieren zwei Spleißvarianten, die neun (AF151046, GI 7106813, 1614 bp) bzw. elf (NM_016474, GI 108773807, 2975 bp) Exons enthalten (NCBI-Datenbank). Die aus 11 Exons bestehende kodierende Sequenz hat neben den 2 zusätzlichen Exons eine längere 3`UTR. Die beiden alternativen Exons befinden sich zwischen Exon 7 und Exon 8 der aus neun Exons bestehenden kodierenden Sequenz. Beide Spleißformen wurden unsererseits bei gesunden Kontrollpersonen gefunden und sind daher nicht als krankheitsrelevant anzusehen. Über die Funktion des Gens liegen zurzeit jedoch keine Daten vor.

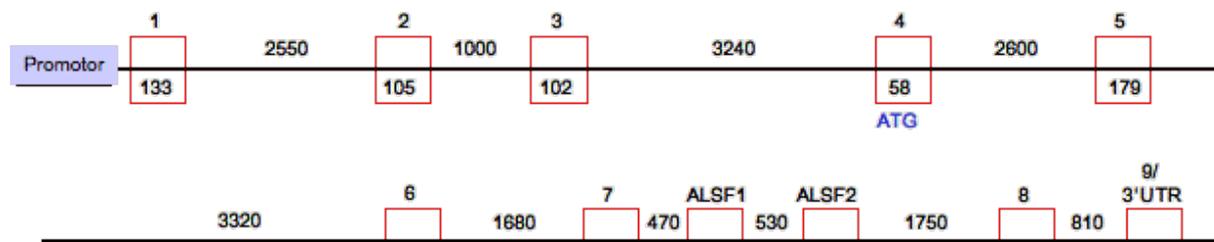


Abb. 3.25: Genomische Struktur des *C3orf19*-Gens. *C3orf19* besteht aus 9 Exons (AF151046, GI 7106813) und hat eine Transkriptlänge von 1614 bp. Das Startkodon befindet sich auf Position 340, das Stoppkodon auf Position 1233. Es existiert eine weitere Variante mit zwei alternativen Exons (ALSF) und einer Transkriptlänge von 2975 bp (NM_016474, GI 108773807). Das Startkodon ATG befindet sich im Exon 4 auf Position 92 des Transkriptes (NM_016474), das Stoppkodon TGA innerhalb der 3`UTR auf Position 1495. Das Protein besteht aus 467 Aminosäuren (NP_057558, GI 108773808). In der Abbildung sind zusätzlich die Exongrößen und die ungefähren Introngrößen in Basenpaare angegeben.

3.12.2 Mutationsscreening und molekulargenetische Analysen des *C3orf19*-Gens

3.12.2.1 Analyse des *C3orf19*-Gens auf genomischer und cDNA-Ebene

Die Sequenzierung des *C3orf19*-Gens wurde an lymphozytärer genomischer DNA und kardialer cDNA von betroffenen Familienmitgliedern durchgeführt. Dabei wurden sowohl die Exons als auch die Promotor- und 3`UTR-Bereiche untersucht. Die bereits unter 3.12.1 erwähnte Spleißvariante mit zwei alternativen Exons konnte u.a. bei einem Betroffenen nachgewiesen werden. Da es sich um eine bereits bekannte Spleißvariante handelt und weitere betroffene Familienmitglieder diese Variante nicht aufweisen, handelt es sich nicht um die gesuchte ARVC auslösende Mutation.

Des Weiteren ergab die Auswertung der Sequenzierung zwei Einzelnukleotidpolymorphismen in der 3`UTR und im Exon 9 vor dem Stoppkodon.

Nukleotidposition	Lokalisation im Gen	Aminosäure	Vergleich mit Datenbank
g.35979 G>A c.1267 G>A	Exon 9	Pro392 kein Austausch	bekannt
g.36982 G>A c.2320 G>A	3`UTR	keine	bekannt

Tab. 3.14: SNP im *C3orf19*-Gen. Die angegebenen Nukleotidpositionen beziehen sich auf den für diese Untersuchungen verwendeten genomischen Klon RP11-708D1 und auf die kodierende Sequenz NM_016474 (NCBI-Datenbank).

Der SNP in Exon 9 konnte nicht nur genomisch nachgewiesen werden, sondern auch anhand der Amplifikation von cDNA. Daraus lässt sich schließen, dass bei betroffenen Patienten beide Allele des *C3orf19*-Gens transkribiert werden und die krankheitsauslösende Mutation die Transkription des mutierten Allels nicht blockiert.

Der Polymorphismus in der 3`UTR auf Position 36982 des genomischen Klons RP11-708D1 bzw. auf Position 2320 der kodierenden Sequenz NM_016474 konnte bei einigen betroffenen Patienten nachgewiesen werden. Weitere betroffene Familienmitglieder waren an dieser Stelle homozygot für die Base Adenin.

Im Bereich des Promotors des *C3orf19*-Gens wurde bei einigen ARVC-Patienten mittels Sequenzierung eine Doppelsequenz festgestellt. Es handelt sich dabei um eine Duplikation der Base Thymin auf dem einen Allel auf Position 16200 des Klons RP11-708D1 und nachfolgend um eine Verschiebung der Basenabfolge um eine Base. Da dieses PCR-Produkt mit einem „reverse“-Primer amplifiziert wurde, verläuft die Doppelsequenz in entgegengesetzter Richtung zum hier vorgegebenen Klon RP11-708D1. Interessanterweise konnte anhand der Amplifikation dieses Promotorbereichs mit dem entsprechenden „forward“-Primer keine Doppelsequenz bei diesen Patienten nachgewiesen werden. Daher liegt die Vermutung nahe, dass es sich in der „reverse“-Sequenz um ein PCR-Artefakt handeln könnte. Im Übrigen wurden die Thymin-Duplikation und die daraus entstehende Doppelsequenz bei weiteren betroffenen Patienten nicht bestätigt.

Im Rahmen von Recherchen in der NCBI-Datenbank wurde ein Transkript gefunden, welches ein Transsspleißen zwischen den ersten 3 Exons vom *C3orf19-Gen* und kodierende Bereiche des *TMEM135-Gens* (transmembrane protein 135) auf Chromosom 11q14.2 darstellt (GI 15214829). Als Transsspleißen wird das Zusammenfügen von Exons unterschiedlicher RNA-Transkripte bezeichnet, welches beim Menschen selten auftritt und hauptsächlich in niederen Organismen wie Nematoden oder Trypanosomen gefunden wurde (Li et al., 2009). Durch die Kombination von Exons aus unterschiedlichen Primärtranskripten kommt es zur Erzeugung unterschiedlicher Proteinvarianten.

Die kodierende Sequenz des Transsspleißens zwischen *C3orf119* und *TMEM-135* hat eine Gesamtlänge von 1639 bp. Dieses Phänomen ließ sich bei keinem der Patienten oder Kontrollpersonen nachweisen. Die Bedeutung des Transsspleißens war somit für unsere Studien untergeordnet, so dass keine weiteren Untersuchungen diesbezüglich vorgenommen wurden.

3.12.2.2 Untersuchung zur Expression des *C3orf19-Gens* in verschiedenen menschlichen Geweben (Northern Blot)

Im Rahmen von Northern-Blot-Analysen konnte eine ubiquitäre Expression des *C3orf19-Gens* in verschiedenen menschlichen Geweben (Herz, Gehirn, Plazenta, Lunge, Leber, Skelettmuskel, Niere und Pankreas) nachgewiesen werden.

Die Expressionsanalysen zeigten in allen untersuchten Geweben die beiden bereits beschriebenen alternativen Spleißformen (siehe 3.12.1). Sie sind in Abbildung 3.26 in einer Größe von 1,6 kb bzw. 3 kb zu erkennen.

Von großer Bedeutung ist die unterschiedlich starke Expression des Gens in den verschiedenen Geweben. Besonders im Skelettmuskel, im Herzen und in der Niere ist die Expression von *C3orf19* sehr stark ausgeprägt. In Geweben wie Gehirn, Lunge oder Plazenta ist die Expression dagegen vergleichsweise gering.

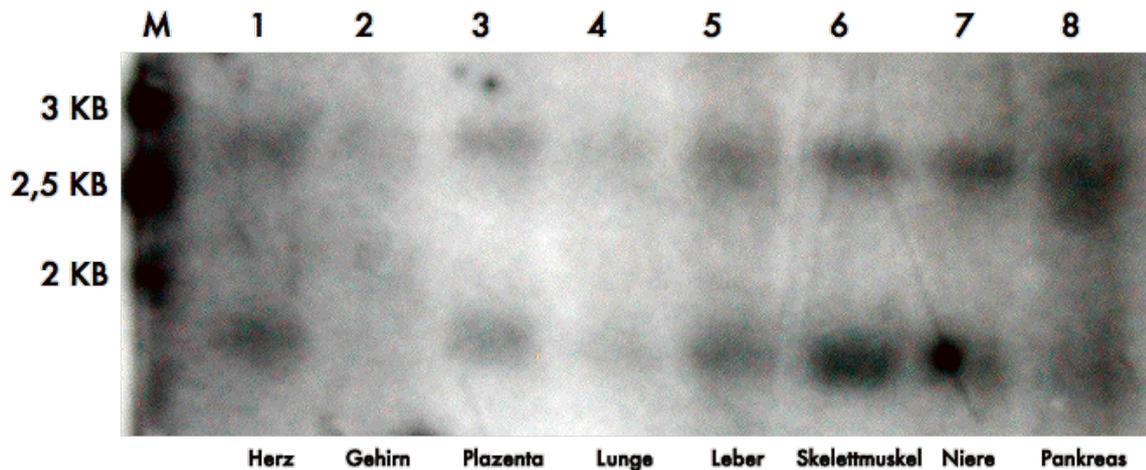


Abb. 3.26: Northern Blot von *C3orf19*. Die beiden bekannten Transkripte von *C3orf19*, in einer Größe von 1,6 kb bzw. 3 kb, werden in gleichem Ausmaß exprimiert. Allerdings sind die Hauptexpressionsorte in der Skelettmuskulatur, Herz und Niere zu finden.

3.13 Das *C3orf20*-Gen (chromosome 3 open reading frame 20; DKFZP434N1817)

3.13.1 Beschreibung und Funktion des *C3orf20*-Gens

In der Literatur gibt es aktuell keine wissenschaftlichen Erkenntnisse über die Funktion dieses Gens. *C3orf20* bildet die zum Telomer gelegene Grenze unseres Locus und liegt nur zum Teil in dem für die Untersuchungen interessanten Bereich. Das Gen erstreckt sich über eine Länge von 97900 Basenpaaren auf dem genomischen Klon RP11-708D1 (GI 13384361) mit insgesamt 17 Exons, wovon sich die ersten 12 Exons innerhalb des Locus befinden. Durch den genetischen Marker REN49088 wird *C3orf20* in einen Teil, der im Locus liegt (auf dem genomischen Klon RP11-708D1 zwischen den Basenpaaren 40110 und 105566), und einem außerhalb gelegenen Bereich getrennt. Es handelt sich um ein mittels komplexer mathematischer und statistischer Berechnungen vorhergesagtes Gen („predicted gene“). Die zugehörige messenger RNA (AL136781, GI 12053074, 2806 bp) kodiert für das hypothetische Protein LOC84077 mit 782 Aminosäuren (CAB66715, GI 12053075).

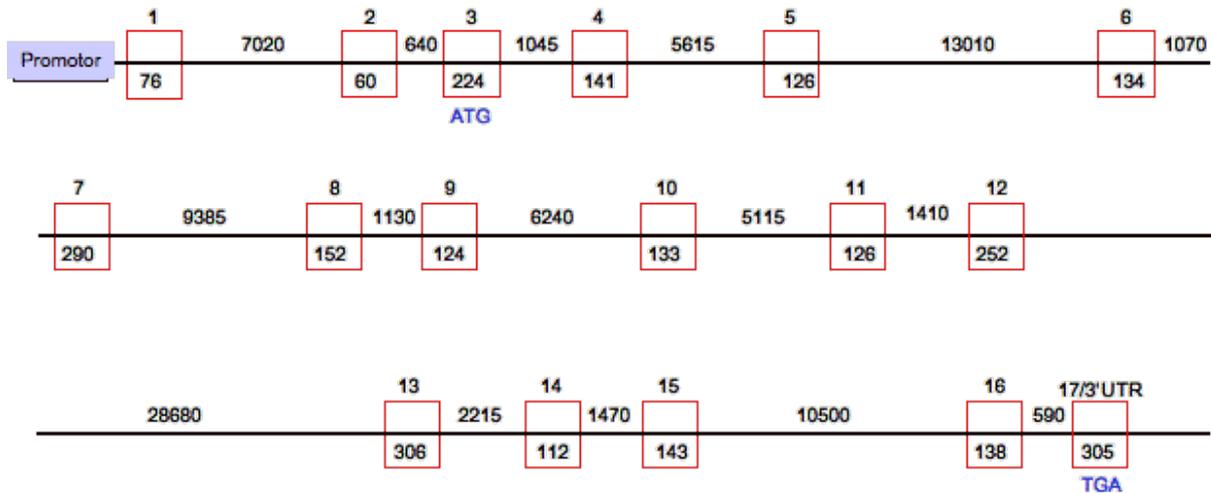


Abb. 3.27: Genomische Struktur des *C3orf20*-Gens. Für die genomischen Analysen wurde der genomische Klon RP11-708D1 (GI 13384361) zugrunde gelegt. In der Abbildung sind die Exon- und Intronlängen dargestellt. Das Startcodon liegt im Exon 3 auf Position 237 und das Stoppcodon im Exon 17 auf Position 2585 des Klons AL136781 (GI 12053074).

Mit Hilfe von Datenbankrecherchen (Stand 2003) wurde eine 1062 Basenpaar lange Sequenz gefunden (GI 17445644, Homo sapiens similar to TIP120-family protein TIP120B (LOC132075), mRNA), die sowohl Ähnlichkeiten zum *C3orf20*-Gen als auch zum TBP-interagierenden Protein (TIP120B, KIAA0667, GI 14730805) aufwies. Durch Vergleich der Sequenzen von *C3orf20* und Homo sapiens similar to TIP120-family protein TIP120B fiel eine Identität zum Exon 16 und zu einem Teilbereich von Intron 15 (auf dem genomischen Klon RP11-708D1 zwischen 136773 und 136892) des *C3orf20*-Gens auf. Die beschriebenen Homologien sind aufgrund der spezifischen Expression des *TIP120B*-Gens im Muskelgewebe interessant (Aoki et al., 1999). Möglicherweise könnte es sich bei dem *C3orf20*-Gen ebenfalls um ein myogenes Gen handeln. Für die Pathogenese der ARVC erscheint eine Mutation in einem muskelspezifischen Gen nahe liegend. Allerdings liegen die homologen, genomischen Bereiche von Intron 15 und Exon 16 nicht mehr in dem von uns beschriebenen Locus.

3.13.2 Mutationsscreening und molekulargenetische Analysen des *C3orf20*-Gens

3.13.2.1 Analyse des *C3orf20*-Gens auf genomischer und cDNA-Ebene

Bei der Sequenzierung an genomischer und kodierender DNA konnten zwei alternative Spleißformen identifiziert werden. Dabei fehlten entweder Exon 7, 8 und 9 oder nur Exon 8 und 9. Der Nachweis der alternativen Spleißformen gelang auch an DNA von Kontrollpersonen, so dass ein Zusammenhang mit der krankheitsauslösenden Mutation ausgeschlossen werden konnte. Tab. 3.15 zeigt eine Übersicht der SNP von *C3orf20*:

Nukleotidposition	Lokalisation im Gen	Aminosäure	Vergleich mit Datenbank
g.79028 c.1089 A>G	Exon 8	Ile285Val I => V	bekannt
g.79073 c.1134 C>G	Exon 8	Leu300Val L => V	nicht bekannt
g. 69313 c. 762 A>G	Exon 7	Ala176Thr A => T	bekannt

Tab. 3.15: Einzelnukleotidpolymorphismen im C3orf20-Gen. Die dargestellten SNP konnten sowohl bei Betroffenen als auch bei Kontrollpersonen in der genomischen und kodierenden DNA nachgewiesen werden. Anders als in der Datenbank waren einige Proben an der Stelle g. 79028 bzw. g. 79073 homozygot für die Base Guanin anstatt für Adenin bzw. Cytosin. Auch im Bereich des Polymorphismus g. 69313 A/G im Exon 7 waren einige Individuen homozygot für die Base Adenin anstatt Guanin wie in der Datenbank beschrieben.

3.14 LOC 285375

3.14.1 Beschreibung und Funktion von LOC 285375

LOC 285375 ist auf der genomischen Karte zwischen den Genen *FBLN2* und *WNT7A* lokalisiert (Stand 03/04). Es handelt sich dabei um ein vorhergesagtes Gen („predicted gene“), welches mittels automatischer, computergestützter Genvorhersageverfahren identifiziert wurde. LOC 285375 kodiert für eine Sequenz von 994 Basenpaaren (XM_211865, GI 27478241) und besteht aus 6 Exons. Auf dem genomischen Klon CTD-2059M21 (GI 24796711) erstreckt sich das Gen auf einer Sequenzlänge von ca. 96000 Basenpaaren. Es existiert zusätzlich eine Spleißvariante von LOC 285375, die zwei alternative Exons enthält (BF508215, GI 11591513).

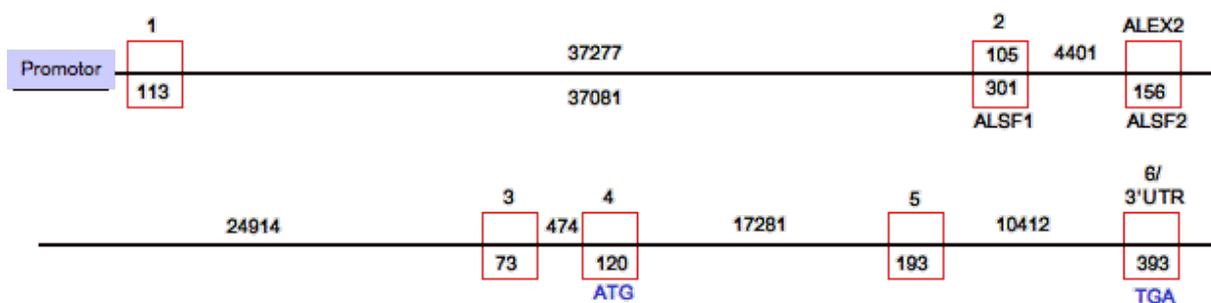


Abb. 3.28: Genomische Struktur von LOC 285375. Der kodierende Bereich des Gens umfasst 6 Exons in einer Länge von insgesamt 994 Basenpaaren (XM_211865, GI 27478241). In der Abbildung sind zusätzlich die alternativen Spleißformen eingezeichnet (BF508215, GI 11591513). Die Spleißform 1 (ALSF1) enthält Exon 2 und ist um ca. 200 bp länger als das native Exon 2. Die Spleißform 2 (ALSF2) besitzt ein alternatives Exon 2 (ALEX2). Das Start – bzw. Stoppkodon befinden sich im Exon 4 auf Position 105 bzw. im Exon 6 auf Position 680 (GI 27478241). Die Exonlängen und die ungefähren Introngrößen sind in Basenpaaren angegeben.

3.14.2 Mutationsscreening und molekulargenetische Analysen von *LOC 285375*

3.14.2.1 Analyse von *LOC 285375* auf genomischer und cDNA-Ebene

Bei der Sequenzierung an genomischer und komplementärer DNA wurden einige SNP im Exon 5 und außerhalb der kodierenden Sequenz gefunden, die auch bei Kontrollen nachgewiesen werden konnten. Konträr zu den restlichen SNP war an folgenden Basenpaarpositionen keine Heterozygotie, sondern eine Homozygotie für die andere als in der Referenzsequenz (GI 24796711) beschriebenen Base zu sehen: 24843 homozygot für C (in Datenbank T), 24850 homozygot für G (in Datenbank A) und 24858 homozygot für T (in Datenbank C). Tabelle 3.16 zeigt eine Zusammenstellung:

Nukleotidposition	Lokalisation im Gen	Aminosäure	Vergleich mit Datenbank
g.24812 C>T	Intron 5	keine	nicht bekannt
g.24813 G>A	Intron 5	keine	nicht bekannt
g.24843 c.600 C>T	Exon 5	keine	nicht bekannt
g.24850 c.593 G>A	Exon 5	keine	nicht bekannt
g.24858 c.585 C>T	Exon 5	keine	nicht bekannt
g.24868 c.575 C>T	Exon 5	keine	nicht bekannt
g.24926 c.517 C>T	Exon 5	keine	nicht bekannt
g.24997 c.446 G>A	Exon 5	keine	nicht bekannt
g.25076 C>T	Intron 4	keine	nicht bekannt
g.25078 C>T	Intron 4	keine	nicht bekannt
g.42312	Intron 4	keine	nicht bekannt

A>G			
g.42994 A>T	Intron 2	keine	bekannt
g.68058 A>G	Intron 2	keine	bekannt

Tab. 3.16: Einzelnukleotidpolymorphismen von LOC 285375. Für die Auswertungen wurden der genomische Klon CTD-2059M21 (GI 24796711) und die kodierende Sequenz (GI 27478241) benutzt. Unter Berücksichtigung der alternativen Spleißformen befindet sich der Polymorphismus g.68058 in Intron 2 explizit in der nicht kodierenden Sequenz zwischen beiden Spleißformen.

IV. Diskussion

4.1 Kandidatengene

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die krankheitsauslösende Mutation für die autosomal-dominant vererbte ARVD5 auf Chromosom 3p25 an 15 kanadischen Familien gesucht. Innerhalb der Arbeitsgruppe wurden im Vorfeld umfangreiche genetische Kopplungsanalysen durchgeführt, die zu einer Einengung und Spezifizierung des bereits von Ahmad und Kollegen (1998) beschriebenen Locus beitragen konnten. Die molekulargenetischen Untersuchungen der 14 Kandidatengene führten zur Identifizierung diverser Spleißformen und Polymorphismen in kodierenden und nicht kodierenden Bereichen, welche zum Teil noch nicht bekannt waren. Weiterhin wurden einige Insertionen und Deletionen unterschiedlichen Ausmaßes, teilweise mit Leserasterverschiebung („frameshift“) der folgenden Sequenz, entdeckt. Diese genetischen Veränderungen stellten sich allerdings als nicht krankheitsrelevant heraus. Zusätzlich zur Untersuchung der Exons, der flankierenden Introns und Promotorbereiche wurden in einigen Genen (*WNT7A*, *GRIP2*, *TPRXL*) orthologe, nicht kodierende DNA-Bereiche sequenziert, welche eine hohe Übereinstimmung zwischen verschiedenen Spezies aufweisen und somit als hochkonservierte Regionen möglicherweise eine wichtige Funktion ausüben. Die ARVD5 auslösende Mutation konnte letztlich im Rahmen dieser Arbeit nicht gefunden werden. Im Folgenden werden zunächst die einzelnen Kandidatengene bezüglich ihrer Funktion und primären Bedeutung für das Mutationsscreening diskutiert.

4.1.1 Das Fibulin-2-Gen

Das Fibulin-2-Gen ist durch seine spezifische Rolle in der embryonalen Entwicklung diverser Organe bei Menschen und Mäusen charakterisiert (Zhang et al., 1996) und in der Differenzierung kardialer, skeletaler und neuronaler Strukturen involviert. Im Northern Blot konnten wir anhand eigener Experimente die starke Expression von *FBLN2* im Herzen bestätigen. Außerdem bestehen Hinweise darauf, dass Fibulin-2 an der Vernetzung der extrazellulären Matrix (ECM) und am Zellzusammenhalt wesentlich beteiligt ist (Miosge et al., 1996). Diese Funktionen von *FBLN2* machten das Gen zu einem Favoriten für die ARVC auslösende Mutation.

4.1.2 Das WNT7A-Gen

Obwohl *WNT7A* im adulten kardialen Gewebe des Menschen nicht mehr exprimiert wird, sondern eine wesentliche Rolle in der embryonalen Herzentwicklung spielt, stellte das Gen als Komponente des Wnt/ β -Catenin-Signalweges einen wichtigen potentiellen Kandidaten dar. In einigen desmosomalen Genen, deren Proteine direkt oder indirekt mit dem Wnt/ β -Catenin-Signalweg interagieren, sind ARVC verursachende Mutationen bekannt (siehe Kapitel I, 1.4.2). Mittlerweile wird die ARVC sogar als Erkrankung des Desmosoms gesehen.

4.1.3 Das HDAC11-Gen

Histon-Deacetylasen spielen eine wichtige Rolle in der Regulation der Zelldifferenzierung und Transkription. Für *HDAC11* ist sowohl eine mutmaßliche Beteiligung an der Genese einer Herzhypertrophie mit konsekutivem Herzversagen (Zhang et al., 2002) als auch eine starke Expression im Herzmuskel beschrieben worden (Yang et al., 1997), so dass auf die Erforschung des Gens ein Schwerpunkt gesetzt wurde. Die Expression im Herzmuskel war in unseren Untersuchungen im Vergleich zu anderen Geweben mittelgradig ausgeprägt.

4.1.4 Das SLC6A6-Gen

Das SLC6A6-Protein stellt funktionell einen Natrium- und Chlorid-abhängigen Taurintransporter (TAUT) dar. Eine pharmakologische in vivo Blockade von TAUT bei Ratten führte einerseits zu einer Reduktion der isometrischen Kontraktionskraft und Zunahme der passiven Compliance des Herzens (Eley et al., 1994), andererseits zu einer Verlängerung der QT-Zeit und folglich zu einer erhöhten Suszeptibilität für Arrhythmien (Lake et al., 1987). Im Gegensatz dazu zeigten TAUT-Knockoutmäuse in Ruhe und unter Belastung eine weitgehend normale Herzfunktion (Warskulat et al., 2007).

Weiterhin konnten zwischen SLC6A6 und dem in der Pathogenese der ARVD2 involvierten Ryanodin-2-Rezeptor Parallelen gefunden werden. Beide Proteine scheinen an der intrazellulären Kalziumhomöostase in der Zelle beteiligt zu sein, so dass *SLC6A6* als ein wichtiges Kandidatengen angesehen wurde.

4.1.5 Das GRIP2-Gen

Die Funktion des *GRIP2-Gens* wird in der Literatur vorwiegend im Bereich des Nervensystems beschrieben. Um die in vivo Funktion von GRIP2 zu beurteilen, wurde das murine Gen inaktiviert. Defiziente Mäuse zeigten einen normalen Phänotyp

(Takamiya et al., 2004). Zusätzlich ist von einer sehr geringen Expression im kardialen Gewebe auszugehen. Aufgrund seines Gewebeexpressionsmusters und der Rolle im Organismus stellte *GRIP2* keinen herausragenden Kandidaten für die ARVC auslösende Mutation dar.

4.1.6 Das NUP210-Gen

gp210 ist ein integrales Membranglykoprotein der Zellkernhülle, welches für die Stabilität und Verankerung des Kernporenkomplexes an der nukleären Membran verantwortlich ist (Greber et al., 1990). Bis dato gibt es keine Hinweise dafür, dass gp210 in der Pathogenese von Herzerkrankungen involviert ist. Hingegen spricht das gemeinsame Auftreten von Antikörpern gegen gp210 und Mitochondrien für die Diagnose einer primär biliären Zirrhose (Muratori et al., 2008). Olsson et al. (1999) fanden mittels in situ Hybridisierung eine bevorzugte Expression von murinem gp210 in Epithelzellen und in Nervengewebe sowie eine verminderte Expression im Herzen.

4.1.7 Das TMEM43-Gen

Über die Funktion des *TMEM43-Gens* war zum Zeitpunkt der Experimente kaum etwas bekannt, weshalb das Gen nicht als Favorit angesehen wurde. Später stellte sich jedoch heraus, dass eine Aminosäure verändernde Punktmutation („Missense“-Mutation) in Exon 11 für die autosomal-dominant vererbte ARVD5 verantwortlich ist (siehe 4.5).

4.1.8 Das CHCHD4-Gen

CHCHD4 ist mutmaßlich am Transport anderer Proteine in den intermembranösen Spalt des Mitochondriums verantwortlich (Hofmann et al., 2005). Eigene Northern-Blot-Experimente zeigten im Vergleich zu anderen Geweben eine verstärkte Expression von *CHCHD4* in der Herz- und Skelettmuskulatur. Diese Ergebnisse sind nicht konsistent mit den Ergebnissen aus RT-PCR- und Western-Blot-Analysen von Hofmann und Kollegen (2005), die eine ausgeprägte Expression von CHCHD4 in Leber und Nieren, gefolgt von anderen Organen einschließlich der Herzmuskulatur, zeigten. Die Methode der RT-PCR besitzt allerdings eine hohe Sensitivität und ist damit vorrangig zur Quantifizierung von mRNA geeignet. Hingegen ist die Northern-Blot-Analyse häufig nicht sensitiv genug, um mRNA mit einer geringen Expressionsstärke nachweisen zu können und erlaubt außerdem nur eine grobe Quantifizierung (Gilliland et al. 1990). In dieser Arbeit wurde die Methode des Northern Blots hauptsächlich zum qualitativen

Nachweis einer Genexpression im kardialen Gewebe gebraucht, weniger zur Quantifizierung zwischen verschiedenen Geweben.

Zusammenfassend war CHCHD4 trotz der Expression im Herzen aufgrund seiner Funktion nicht von primärem Interesse für die Mutationssuche.

4.1.9 Das TPRXL-Gen

Das *TPRXL-Gen* ist ein Pseudogen, welches zur Homeobox-Genfamilie gehört. Da es per definitionem nicht für ein funktionelles Protein kodiert, war *TPRXL* für das Mutationsscreening nicht von besonderer Relevanz. Bis auf eine regulative Funktion in der frühen embryonalen Entwicklung als Mitglied der Homeobox-Genfamilie gibt es über die Bedeutung des *TPRXL-Gens* bisher keine weiteren Erkenntnisse.

4.1.10 Das LSM3-Gen

LSM3 ist aufgrund seiner Funktion in der Prä-mRNA-Prozessierung und der mRNA-Degradation als Bestandteil des snRNP-Komplexes („small nuclear ribonucleoprotein“) interessant. Dennoch gibt es bisher keinen Hinweis für eine Beteiligung an der Pathogenese von Herzerkrankungen.

4.1.11 Das XPC-Gen

Mutationen im *XPC-Gen* sind pathognomonisch für das Krankheitsbild der Xeroderma pigmentosum mit erhöhter Suszeptibilität für Hautkrebs. Es besteht nach heutigem Wissensstand keine Verbindung zwischen Mutationen im *XPC-Gen* und kardialen Krankheitsentitäten.

4.1.12 Das C3orf19-Gen

Innerhalb von Northern-Blot-Untersuchungen konnten wir eine unterschiedlich starke Expression des *C3orf19-Gens* in verschiedenen Geweben dokumentieren. Besonders im Skelettmuskel, Herzen und in der Niere war eine erhöhte Expression festzustellen. Zur Funktion des Gens gibt es aktuell keine Erkenntnisse.

4.1.13 Das C3orf20-Gen

C3orf20 liegt nur teilweise in dem für die Untersuchungen interessanten Bereich. Über seine Funktion war nichts bekannt, so dass lediglich die im Locus liegenden Exons sequenziert wurden, ohne weitere Experimente (z.B. Southern Blot) durchzuführen.

4.1.14 LOC 285375

LOC 285375 ist ein vorhergesagtes Gen („predicted gene“), welches mittels automatischer, computergestützter Genvorhersageverfahren identifiziert wurde. Dementsprechend war zum Zeitpunkt der Experimente weder etwas über die Funktion noch über die sichere Existenz des Gens bekannt. Außer der Sequenzierung wurden keine weiterführenden Versuche vorgenommen. Im Nachhinein wurde *LOC 285375* aus der Datenbank (NCBI) entfernt.

4.2 Polymorphismen

4.2.1 Einzelnukleotidpolymorphismen (SNP)

SNP sind häufige genetische Variationen, die durch einen Austausch einzelner Basen in kodierenden und nicht kodierenden sowie regulatorischen Bereichen von Genen charakterisiert sind. Die Frequenz ihres Auftretens beim Menschen wird auf 1/100-300 Basen geschätzt (Chorley et al., 2008). Im Gegensatz zur Punktmutation sind Polymorphismen durch eine Allelfrequenz von $> 1\%$ in der Population definiert (Hunt et al., 2009). Die meisten SNP liegen in nicht kodierenden Bereichen. SNP sollen neben anderer Mechanismen bezüglich der interindividuellen Vielfältigkeit, des Ansprechens auf Medikamente und der Suszeptibilität für komplexe multifaktorielle Erkrankungen wie z.B. Diabetes mellitus, Fettleibigkeit, arterielle Hypertonie oder psychiatrische Krankheitsentitäten, eine wesentliche Rolle spielen (Shastri, 2009).

Die umfangreiche Sequenzierung von 14 Genen in dieser Arbeit, einschließlich großer Bereiche der Introns und Promotorsequenzen, führte zur Identifizierung multipler SNP. Diese wurden sowohl bei Kontrollpersonen als auch in DNA-Analysen Betroffener beobachtet. Viele der SNP sind bisher noch nicht beschrieben worden. Der Vergleich erfolgte mit der SNP-Datenbank von NCBI (dbSNP).

Die Einzelnukleotidpolymorphismen in den nicht kodierenden Regionen haben vermutlich keinen direkten Effekt auf den Phänotyp. Allerdings können die im Bereich regulatoriver Sequenzen (wie z.B. Promotor oder 3'UTR) einiger Gene entdeckten genetischen Variationen Auswirkungen auf die Genexpression, Spleißfunktion oder Stabilität der mRNA haben.

In den kodierenden Bereichen konnten synonyme und nicht synonyme SNP gefunden werden. Der Basenaustausch nicht synonyme SNP führt zum Einbau einer anderen Aminosäure in das Protein. Inwieweit dieser Aminosäureaustausch zu einer veränderten oder sogar deletären Proteinform führt, wurde in dieser Arbeit nicht

untersucht. Lange Zeit wurde vermutet, dass die synonymen Einzelnukleotidpolymorphismen, welche basierend auf der Degeneration des genetischen Codes nicht zu einem Aminosäureaustausch führen, keine Bedeutung besitzen. Dennoch häufen sich Hinweise, dass synonyme SNP das Spleißen und die Stabilität der mRNA sowie die Tertiärstruktur des Proteins beeinflussen können (Hunt et al., 2009).

Bei der Auswertung der Sequenzen fiel mehrfach eine Häufung von SNP in bestimmten Regionen auf (SNP-Cluster). Meist handelte es sich dabei um nicht kodierende Sequenzen.

Im Pseudogen *TPRXL* konnten multiple Einzelnukleotidpolymorphismen in Exon 3 gefunden werden. Es ist bekannt, dass ein geringer Teil der Pseudogene transkribiert wird, jedoch trifft das für *TPRXL* vermutlich nicht zu. Da das Gen nicht für ein Protein kodiert, kann es durch die Polymorphismen nicht zu einem Aminosäureaustausch kommen. Das gehäufte Auftreten der SNP kann im Rahmen des geringen Selektionsdrucks interpretiert werden, welchem das Pseudogen vermutlich ausgesetzt ist. Daher können sich relativ leicht Mutationen sammeln, deren Auswirkung auf das Individuum schwer eingeschätzt werden kann. So könnten für den Organismus sowohl vorteilhafte als auch nachteilige Mutationen entstehen.

Die Mehrzahl der in den 14 Genen gefundenen Einzelnukleotidpolymorphismen lag in heterozygoter Form vor. Allerdings konnten an genomischer und komplementärer DNA von Betroffenen oder Kontrollen sowohl in kodierenden als auch in nicht kodierenden Bereichen homozygote SNP in den Genen *WNT7A*, *HDAC11*, *SLC6A6*, *GRIP2*, *NUP210*, *TMEM43* und *C3orf20* gefunden werden. Im Gegensatz dazu lagen alle gefundenen SNP in den Genen *TPRXL*, *FBLN2* und *LOC 285375* ausschließlich in heterozygoter Form vor.

Die Allelfrequenz der einzelnen SNP wurde in dieser Arbeit nicht analysiert. Es ging vielmehr darum, durch den Vergleich der SNP auf genomischer und cDNA-Ebene bei Betroffenen möglicherweise indirekte Hinweise für die Mutation zu erhalten. Aufgrund des autosomal-dominanten Erbgangs der ARVD5 könnte beispielsweise eine Mutation in regulatorischen Bereichen wie dem Promotor auf cDNA-Ebene zu einer fehlenden Expression des kranken Allels führen, so dass nur das gesunde Allel exprimiert wird. Die Sequenzierung würde folglich einen heterozygoten SNP in der genomischen Sequenz und einen homozygoten Polymorphismus in der cDNA-Sequenz zeigen.

Die cDNA-Analyse aller heterozygoter genomischer SNP des *GRIP2-Gens* ergab bei ARVD-Patienten eine Homozygotie für den jeweiligen Polymorphismus. Dadurch wurde das Gen trotz der sehr schwachen Expression im Herzen und seiner primären Funktion im Nervensystem im Rahmen der Mutationssuche interessant. Es folgten weiterführende Untersuchungen mittels Southern Blot sowie Prüfung auf Kosegregation. Bei der Kosegregationsanalyse wird die Tatsache ausgenutzt, dass zwei nahe beieinander liegende Regionen auf einem Chromosom eine hohe Wahrscheinlichkeit haben, auch nach dem „crossing over“ der Meiose nebeneinander zu liegen, und so gemeinsam an die nächste Generation vererbt zu werden. Im vorliegenden Fall konnte mittels der Kosegregationsanalyse geprüft werden, welches der beiden Allele des SNP auf genomischer Ebene mit dem krankhaften, ARVD5 auslösenden Allel kosegregierte. Dadurch konnte eine Aussage darüber gemacht werden, welches der beiden Allele in der komplementären DNA exprimiert wird. Die Analyse führte zu einem inkongruenten Ergebnis, da von einigen SNP auf cDNA-Ebene das krankhafte Allel, von anderen das gesunde Allel exprimiert wurde. Auch die Southern-Blot-Ergebnisse zeigten bis auf eine zusätzliche Bande bei der Restriktion mit der Endonuklease BamH I keine wegweisenden Befunde. Diese Bande konnte letztlich sowohl bei Betroffenen als auch bei Kontrollpersonen nachgewiesen werden (siehe Kapitel III, 3.5.2.2).

Ähnliche Diskrepanzen mancher SNP zwischen genomischer und komplementärer DNA wurden bei *WNT7A* im Exon 3 gefunden. Dort zeigte die Kosegregationsanalyse eine Expression des gesunden Allels der auf cDNA-Ebene homozygoten Einzelnukleotidpolymorphismen. Die folgende Southern-Blot-Untersuchung von Exon 3 ergab sowohl bei Betroffenen als auch bei Gesunden eine zusätzliche, 2,5 kb große Bande, welche vermutlich durch einen Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus verursacht wurde (siehe Kapitel III, 3.2.2.2).

Interessanterweise konnten in den Genen *CHCHD4* und *LSM3* weder genomisch noch an komplementärer DNA Polymorphismen gefunden werden. Dies lässt sich möglicherweise durch die eingeschränkte Größe der beiden Gene erklären.

Als Methode zur Detektion der SNP in dieser Arbeit wurde nicht nur die Sequenzierung, sondern auch zu einem geringeren Teil die DHPLC benutzt. Um nachzuprüfen, ob es sich bei dem im Southern Blot von Exon 2 des *FBLN2-Gens* beschriebenen, zunächst nur bei ARVC-Patienten entdeckten Restriktionsmuster um die Krankheit auslösende Mutation handelt, erfolgte die Untersuchung des *FBLN2-Gens* an DNA von 94

Betroffenen und Kontrollpersonen mittels DHPLC als Hochdurchsatzmethode mit sehr hoher Spezifität und Sensitivität (Xiao et Oefner, 2001). Ähnlich wie in anderen Genen konnten auch hier SNP in kodierenden und nicht kodierenden Bereiche sowie synonyme und nicht synonyme Polymorphismen identifiziert werden. Eine Häufung von Polymorphismen wurde im Exon 2 von *FBLN2* beobachtet. Im Nachhinein stellte sich heraus, dass die zusätzlichen Banden im Southern Blot vermutlich durch eine Plasmidkontamination entstanden waren (siehe Kapitel III, 3.1.2.2).

Zusammenfassend war keiner der in den 12 von 14 Genen gefundenen Basenaustausche verdächtig, die ARVD5 auslösende Mutation zu verursachen. Bei den bisher unbekanntem und von uns detektierten SNP konnte über die Allelfrequenz in der Population keine Aussage gemacht werden. Nichtsdestotrotz konnte bei positivem Nachweis des SNP bei Kontrollpersonen und/oder negativem Nachweis bei weiteren betroffenen Personen von einer nicht krankheitsrelevanten genetischen Variation ausgegangen werden.

4.2.2 Deletions- und Insertionspolymorphismen

Deletions- bzw. Insertionspolymorphismen sind durch eine Deletion oder Insertion einzelner oder mehrerer Nukleotide in einer Sequenz charakterisiert, die zu einer Verschiebung des Leserasters beitragen können. Die Polymorphismen unterscheiden sich von einer Mutation in der Häufigkeit ihres Auftretens innerhalb einer Population. Analog der Einzelnukleotidpolymorphismen spricht man ab einer Allelfrequenz $> 1\%$ von einem Deletions- bzw. Insertionspolymorphismus.

Die Sequenzierung der 14 Kandidatengene führte zur Identifizierung mehrerer Deletionspolymorphismen sowohl in der kodierenden Sequenz als auch in Intronbereichen.

Die im *SLC6A6-Gen* nach dem Stoppkodon in Exon 15/3'UTR beschriebene 1-Basendeletion führte nicht zu einer Verschiebung des Leserasters und hat dadurch womöglich keine Auswirkung auf den Phänotyp (siehe Kapitel III, 3.4.2.1). Im Gegensatz dazu kam es im *WNT7A-Gen* durch eine 1-Basendeletion von Adenin im Exon 2 zu einer konsekutiven Leserasterverschiebung und Stoppkodon in Exon 4 (siehe Kapitel III, 3.2.2.1). Allerdings waren weitere Patientenproben von dieser Deletion nicht betroffen, so dass kein Zusammenhang mit der ARVD5 auslösenden Mutation zu sehen ist.

Zwei 1-Basendeletionen konnten in Intron 13 bzw. Intron 22 des *GRIP2*-Gens zunächst nur bei betroffenen Personen detektiert werden (siehe Kapitel III, 3.5.2.1). Obwohl die Deletionen im nicht kodierenden Bereich des Gens lokalisiert sind, könnten durch eine Affektion regulativer Sequenzen Auswirkungen auf den Phänotyp auftreten. Die Prüfung beider Deletionen auf vollständige Kosegregation erbrachte aber keine Segregation zum krankhaften Allel, so dass nicht von einer Krankheit verursachenden Mutation ausgegangen werden kann.

Eine 10-Basendeletion eines Allels im Intron 27 von *NUP210* führte zur Verschiebung des Leserasters (siehe Kapitel III, 3.6.2.1). Dadurch, dass auch Sequenzen von Kontrollpersonen betroffen waren, wurde dieser Deletion keine weitere Bedeutung bei der Entstehung der ARVD5 beigemessen. Auch im *GRIP2*-Gen wurde eine 20-Basendeletion im Exon 5 entdeckt, welche sich allerdings bei anderen Betroffenen nicht reproduzieren ließ (siehe Kapitel III, 3.5.2.1).

4.3 Alternative Spleißformen

Durch alternatives Spleißen eukaryotischer Gene kann die Expression strukturell ähnlicher Proteine ermöglicht werden, welche sich in einigen Domänen unterscheiden und folglich eine andere Funktion ausüben können. Dadurch wird im Genom zusätzliche Komplexität bewirkt. Alternative Spleißvarianten können nach der Transkription eines Gens bei der Prozessierung des RNA-Primärtranskripts entstehen. Es wird vermutet, dass bis zu 80% der humanen Gene alternativ gespleißt werden (Lee et Wang, 2005). Dabei werden andere als die beim konstitutiven Spleißen üblichen Spleißstellen verwendet.

4.3.1 Exondeletion/Exonskipping

Eine Form des Spleißens stellt die Exondeletion bzw. Exonskipping dar, die durch Spleißen mancher Exons wie Introns aus der reifen mRNA charakterisiert ist. Der Leserahmen bleibt gewöhnlich erhalten, unabhängig davon, ob das Exon herausgespleißt wird oder nicht.

Für *HDAC11* wurden beispielsweise mehrere Exondeletionen bei unterschiedlichen Individuen nachgewiesen. Am häufigsten war ein „Skipping“ der Exons 4, 5 und 6 zu identifizieren. Bei einer DNA-Probe fehlten die Exons 4-8, ohne dass anschließend eine Leserasterverschiebung zu verzeichnen war. Diese Exondeletionen stehen nicht in Verbindung mit den bekannten zwei Transkriptisoformen von *HDAC11*. NM_024827.3 (GI 227430412, *HDAC11* Isoform 1) und NM_001136041 (GI 227430411, *HDAC11*

Isoform 2) unterscheiden sich in der 5'UTR/Exon 1 mit alternativen Startkodons und dem Exon 4 voneinander. Im Northern Blot konnten wir in einigen Geweben (Skelettmuskel, Gehirn, Niere, Pankreas) zwei Transkriptformen nachweisen. Diese entsprechen am ehesten den beiden Isoformen aus der NCBI-Datenbank. Da das Spleißen von prä-mRNAs in verschiedenen Geweben unterschiedlich erfolgen kann, wundert es nicht, dass im Northern Blot eine gewebespezifische Expression der Isoformen zu finden war. Die oben beschriebenen Exondeletionen sind bisher nicht beschrieben worden.

Die beiden bekannten Spleißvarianten von *C3orf19*, die neun (AF151046, GI 7106813) bzw. elf (NM_016474, GI 108773807) Exons enthalten, konnten in der ARVC-Kohorte und bei Kontrollpersonen ebenfalls nachgewiesen werden.

Weitere Spleißformen mit Exondeletionen und ohne folgender Verschiebung des Leserasters wurden in den Genen *C3orf20* (Deletion der Exons 7-9 oder 8-9), *GRIP2* (Deletion von Exon 6), *NUP210* (Deletion von Exon 30) und *TMEM43* (Deletion von Exon 9) gefunden. Keine dieser Spleißvarianten führte zu einem neuen Start- oder Stoppkodon.

Auch im *XPC-Gen* gab es Hinweise auf eine Deletion der Exons 4 und 5. Allerdings konnte dieses „Exonskipping“ nur auf dem einen Allel dokumentiert werden. Das zweite Allel exprimierte die vollständige Sequenz. Da die Amplifikation der restlichen Exons keine Auffälligkeiten zeigte, ist eine Verschiebung des Leserasters unwahrscheinlich. Zudem sind in der NCBI-Datenbank zwei Isoformen des *XPC-Gens* beschrieben worden. Der kürzeren Transkriptvariante 2 (NM_001145769, GI 224809301) fehlt das Exon 4 der längeren Isoform 1 (NM_004628.4, GI 224809294).

Zusammenfassend kamen sämtliche dieser entdeckten Spleißvarianten in diversen Genen nicht als ARVD5 auslösende genetische Aberration in Frage, weil die entsprechende Spleißform entweder auch bei Kontrollpersonen nachgewiesen werden konnte, oder bei anderen Betroffenen fehlte.

4.3.2 Intronretention

Bei dieser einfachsten Form des alternativen Spleißens kann ein Intron in der reifen RNA verbleiben, ohne dass es wie üblicherweise herausgespleißt wird. Bleibt der offene Leserahmen dabei erhalten, kommt es zum Einfügen von Peptidsegmenten in das ursprüngliche Protein. Falls er nicht erhalten bleiben sollte, kann es aufgrund der

Leserasterverschiebung zum Abbruch der Genprodukte und folglich zu funktionslosen Proteinen kommen.

Das Phänomen der Intronretention wurde in dieser Arbeit einmalig bei *SLC6A6* nachgewiesen. Die Amplifikation von kodierender DNA eines Betroffenen zeigte eine Retention von Intron 8. Die restlichen Introns waren erwartungsgemäß herausgespleißt worden. Die sich aus der Intronretention für die Proteinstruktur ergebende Konsequenz wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter verfolgt. Von besonderer Relevanz für die primäre Fragestellung war die fehlende Reproduktion dieser Intronretention bei anderen betroffenen und gesunden Personen.

4.3.3 Alternative 5'-Donor- und 3'-Akzeptorspleißstellen

Normalerweise werden die intronischen Bereiche aus der prä-mRNA über spezifische Erkennungssequenzen herausgespleißt. Diese intronischen 5'-Enden (Donorspleißstellen) und 3'-Enden (Akzeptorspleißstellen) werden jeweils durch Dinukleotide markiert, deren Sequenzen als Angriffspunkte für den Spleißapparat in fast allen Introns identisch sind.

Im *GRIP2-Gen* wurden in komplementärer DNA eines Betroffenen Bruchpunkte im Exon 9 bzw. im Exon 17 mit konsekutiver Deletion der dazwischen liegenden Sequenz identifiziert (siehe Kapitel III, 3.5.2.1). Dies führte zur Annahme, dass diese genetische Aberration möglicherweise durch eine Aktivierung alternativer kryptischer (irregulärer) Spleißstellen, welche im Exon lokalisiert sind, ausgelöst wurde. Da die Bruchpunkte in beiden Exons liegen, müssten sowohl die reguläre 5'-Donor- als auch die reguläre 3'-Akzeptorspleißstelle betroffen sein. Das simultane Auftreten von Mutationen in beiden Spleißstellen ist eher unwahrscheinlich. Weiterhin konnte diese Deletion bei anderen ARVC-Patienten nicht reproduziert werden.

Eine ähnliche Konstellation ergab sich bei der Sequenzierung von kodierender DNA des *FBLN2-Gens*. Einige Betroffene und Kontrollen wiesen eine ca. 340 bp große Deletion in Exon 2 auf (siehe Kapitel III, 3.1.2.1), ohne dass dadurch das in Exon 2 lokalisierte Startkodon verändert wurde. Eine Verschiebung der Deletion um ca. 20 bp in 5'-Richtung konnte als Variante dieser Spleißform bei einem Betroffenen gefunden werden. Da die Deletion nur Teile von Exon 2 betrifft, handelt es sich hierbei womöglich eher um einen Deletionspolymorphismus, der nicht krankheitsrelevant ist, als um eine Spleißvariante.

4.4 Methodenspezifische Probleme der Polymerase-Kettenreaktion

Die PCR stellt das in dieser Arbeit am häufigsten verwendete molekularbiologische Verfahren dar. Die Methode erlaubt einen schnellen und empfindlichen Nachweis kleinster Mengen von DNA. Gerade aufgrund der hohen Sensitivität ist die PCR allerdings anfällig gegenüber Kontaminationen, welche zur Veränderung der Bandenmuster führen können. Weitere PCR-Artefakte, wie etwa das unspezifische Binden des Primers an DNA bei geringer Annealingtemperatur, Primerdimerisierung, Bildung von Sequenzchimären oder unvollständige DNA-Präparationen aus dem Probenmaterial können zur Verfälschung molekularer Analysen führen.

Ein weiteres Problem kann bei der Amplifikation von GC-reichen Regionen auftreten. Trotz sorgfältiger Primerauswahl und Optimierung der PCR-Bedingungen gelang die Amplifizierung eines GC-reichen DNA-Abschnittes in der 3'UTR von *GRIP2* nicht (siehe Kapitel III, 3.5.2.1). Eine ähnliche Problematik bestand in der Promotorregion von *WNT7A*, die letztlich durch umfangreiche Adjustierung der Versuchsbedingungen umgangen werden konnte (siehe Kapitel III, 3.2.2.1).

Während der Experimente fielen mehrmals Fehler bei der Amplifikation von Mononukleotid- bzw. Dinukleotidwiederholungssequenzen auf. Beispielsweise führte die Untersuchung der 3'UTR von *SLC6A6* zur Identifizierung von Basendeletionen im Bereich eines poly-A-Stretches. Zwischen den einzelnen DNA-Proben schwankte die Anzahl der deletierten Basenpaare. Analog war im Intron 1 von *TMEM43* in einem poly-T-Stretch eine variable Anzahl an Insertionen der Nukleotidbase Thymin verschiedener Individuen zu verzeichnen (siehe Kapitel III, 3.7.2.1). Auch im Promotor von *HDAC11* wurde eine 1-Basen-Insertion von Thymin im Bereich eines poly-T-Stretches gefunden, die sich durch bidirektionale Sequenzierung nicht bestätigen ließ (siehe Kapitel III, 3.3.2.1). In der Literatur ist dieses Phänomen bereits beschrieben worden, so dass wir nicht von einem Deletions- bzw. Insertionspolymorphismus, sondern von einem PCR-spezifischen Amplifikationsproblem ausgegangen sind (Clarke et al., 2001).

Im Promotor des *C3orf19-Gens* fiel eine Duplikation der Base Thymin bei einigen ARVC-Patienten mit folgender Verschiebung des Leserasters auf (siehe Kapitel III, 3.12.2.2). Da diese Aberration durch bidirektionale Sequenzierung nicht reproduziert werden konnte, handelt es sich in der „reverse“-Sequenz am ehesten um ein PCR-Artefakt.

Die Sequenzierung eines Teils der Promotorregion von *TMEM43* zeigte einmalig nach Vergleich mit der NCBI-Datenbank keine Homologien zum *TMEM43-Gen*, sondern zu

Genomabschnitten von Chromosom 2 und 14. Dies ist am ehesten auf eine unspezifische Bindung der Primer bei relativ niedriger Annealingtemperatur zurückzuführen. Die Wiederholung der PCR mit identischer genomischer DNA führte zur Amplifikation des gewünschten Promotorbereichs von *TMEM43*.

Ein anderes Phänomen, welches gelegentlich auftrat, waren unsaubere Doppelsequenzen, die sich nicht voneinander subtrahieren ließen. Beispielsweise waren Bereiche der 3'UTR von *XPC* und Intron 4 von *HDAC11* betroffen. Diese Doppelsequenzen ließen sich durch bidirektionale Sequenzierung im Falle von *HDAC11* bestätigen und im Falle von *XPC* nicht bestätigen. Als Ursache der Doppelsequenzen sind am ehesten Kontaminationen zu sehen.

Gelegentlich fielen in der unidirektionalen Sequenzierung ungeschlossene Spleißformen auf. Im *TMEM43*-Gen wurden mittels „reverse“-Primer verschiedene Bereiche des Promotors in einer Sequenz amplifiziert, die nicht zusammenhängend waren und auf eine Spleißform deuteten (siehe Kapitel III, 3.7.2.1). Dies ließ sich mit der „forward“-Sequenz nicht reproduzieren, so dass dieses Produkt als PCR-Artefakt und nicht als alternative Spleißform interpretiert wurde.

Bei der Amplifikation von *NUP210* an genomischer DNA von Betroffenen und Kontrollen wurde zunächst der Verdacht auf eine Spleißform mit alternativen 5'-Donor- und 3'-Akzeptorspleißstellen gestellt. Auf dem einen Allel fehlten Teile von Exon 27 und 28, währenddessen das andere Allel die erwartete Sequenz exprimierte (siehe Kapitel III, 3.6.2.1). Da sich dieses Phänomen nicht durch bidirektionale Sequenzierung wiederholen ließ, wurde es als methodenspezifisches Problem der PCR gewertet.

4.5 Mutation im *TMEM43*-Gen führt zu *ARVD5*

Die Krankheit auslösende Mutation für autosomal-dominant vererbte *ARVD5* wurde nach Beendigung unserer Experimente im *TMEM43*-Gen identifiziert (Merner et al., 2008). Insgesamt wurden 20 Kandidatengene untersucht. In unserem Locus bildete *C3orf20* die zum Telomer gelegene Grenze und lag nur zum Teil in dem für die Untersuchungen relevanten Bereich. In der vorliegenden Publikation wurde der krankheitsrelevante Locus deutlich größer definiert und umfasste 7 weitere Gene. *IQSEC1* liegt neben *NUP210* in Richtung Zentromerregion. *FGD5*, *NR2C2*, *MRPS25*, *ZFYVE20*, *CAPN7* und *SH3BP5* sind hinter *C3orf20* in Richtung Telomer lokalisiert, so dass *C3orf20* komplett im relevanten Bereich liegt und nicht die Grenze des Locus bildet. Die Mutation wurde jedoch in einem bereits von uns untersuchten Gen gefunden.

Durch bidirektionale Sequenzierung konnte eine seltene genetische Variante im *TMEM43-Gen* auf Position 1073 C => T des cDNA-Klons NM_024334 (GI 13236586) identifiziert werden. Die Allelfrequenz betrug <1%. Diese Mutation liegt im Exon 11 und führt zu einem nicht synonymen Aminosäureaustausch (S358L) in einer hochkonservierten transmembranären Domäne von *TMEM43*. Das mutierte Allel, welches bei allen Betroffenen nachgewiesen und bei Kontrollpersonen ausgeschlossen werden konnte, wurde durch Kosegregationsanalysen dem ARVD5-Haplotyp zugeordnet. Im Hinblick auf die Funktion des Gens existieren Hinweise dafür, das *TMEM43* mit dem adipogenen Transkriptionsfaktor $PPAR\gamma$ interagiert. Dadurch könnte der fibrös-fettige Ersatz des Myokardiums erklärt werden. Adipogene Transkriptionsfaktoren sind bereits als Komponenten eines komplexen Signalweges in der Pathogenese der ARVC beschrieben worden. Garcia-Gras und Kollegen (2006) fanden heraus, dass eine Suppression der Expression von Desmoplakin zu einer Translokation des desmosomalen Proteins Plakoglobin in den Zellkern und folgend über die Transkriptionsfaktoren Tcf/Lef1 zu einer Reduktion des Wnt/ β -catenin-Signalweges führt. Konsekutiv kommt es zu einer erhöhten Expression der fibro- und adipogenen Gene *C/EBP- α* (MIM 116897) and *PPAR γ* (MIM 601487), die für eine Fettakkumulation im Myokard verantwortlich sind.

Zum anderen fanden Bengtsson und Otto (2008) heraus, dass das Protein LUMA als Bestandteil der inneren nukleären Membran und des Endoplasmatischen Retikulums über eine Interaktion mit dem nukleären Protein Emerin dessen Verteilung an der nukleären Membran beeinflusst. In dieser Publikation entspricht das humane LUMA *TMEM43*. Sowohl eine Überexpression von LUMA als auch Abbruchmutationen führten zu einer Beeinträchtigung der Verteilung von Emerin, welches in der Pathogenese der Emery-Dreifuß-Muskeldystrophie involviert ist. LUMA ist vermutlich essentiell für die Organisation von Proteinkomplexen in der inneren nukleären Membran und den Erhalt der nukleären Hülle. Da die Oligomerisierung von LUMA über seine vier transmembranären Domänen erfolgt, können Mutationen in diesen Domänen zu einer Unterbrechung der Membranstruktur führen und damit eine verheerende Auswirkung auf die Zelle haben. Die für ARVD5 verantwortliche Mutation im *TMEM43-Gen* befindet sich gerade innerhalb einer dieser hochkonservierten transmembranären Domänen. Der hohe Grad an Homologie der Aminosäuresequenz zwischen verschiedenen Spezies und das Vorkommen dieses Proteins in vielen verschiedenen Organismen macht LUMA zu einem in seiner Funktion einmaligen und unersetzlichen Protein.

Das *TMEM43*-Gen wurde unsererseits an kardialer und lymphozytärer DNA von Betroffenen und Kontrollen sequenziert und mittels Southern Blot überprüft. Die Ergebnisse aus der Autoradiographie waren im Vergleich zwischen Kontrollen und Betroffenen identisch und ergaben keinen Hinweis für eine genetische Veränderung. Die Southern-Blot-Sonde umfasste die Exons 2 bis 11. Allerdings ist die Southern-Blot-Methode vorwiegend zum Nachweis größerer genomischer Deletionen oder Duplikationen geeignet und besitzt gegenüber der Detektion von Punktmutationen eine deutlich niedrigere Sensitivität als die Sequenzierung. Dass die Krankheit verursachende Punktmutation über diese Methode nicht entdeckt wurde, ist folglich nicht ungewöhnlich.

Die Sequenzierung von *TMEM43* führte zur Identifikation einer Spleißform ohne Exon 9, die bisher noch nicht beschrieben worden ist. Sie ist nicht krankheitsrelevant, da sie nicht bei allen ARVC-Patienten reproduziert werden konnte (siehe Kapitel III, 3.7.2.1). Eine weitere Spleißform im Promotor konnte durch bidirektionale Sequenzierung nicht bestätigt werden und wurde lediglich bei einem Betroffenen gesehen, so dass am ehesten von einem methodenspezifischen Problem im Rahmen der PCR ausgegangen werden kann (siehe 4.4).

Letztlich wurden mehrere Einzelnukleotidpolymorphismen in der nicht kodierenden und kodierenden Sequenz nachgewiesen. Die ARVD5 auslösende Mutation wurde im Rahmen unserer Experimente zwar gesehen, aber nicht als krankheitsrelevant eingeordnet (siehe Kapitel III, 3.7.2.1). Dies lag daran, dass die Sinn verändernde Mutation in unseren Untersuchungen auch bei Kontrollpersonen gefunden worden war, und folglich als nicht krankheitsrelevante genetische Variante eingeordnet wurde. Nach erneuter Sequenzierung des Exon 11 von *TMEM43* konnten wir das Ergebnis von Merner und Kollegen (2008) bestätigen, so dass es sich initial um einen Vertausch von Proben gehandelt haben muss. Die Mutation war letztlich ausschließlich bei Betroffenen nachzuweisen.

V. Zusammenfassung

Die arrhythmogene rechtsventrikuläre Kardiomyopathie (ARVC) ist durch einen fibrös-fettigen Ersatz der rechtsventrikulären freien Wand charakterisiert. Konsekutiv kann es zu Herzrhythmusstörungen, Herzinsuffizienz und plötzlichem Herztod kommen. Da durch eine ICD-Implantation bei asymptomatischen Patienten mit familiärem Auftreten der Erkrankung ein plötzlicher Herztod verhindert werden kann, gewinnt die Genetik zunehmend an Bedeutung.

Die krankheitsauslösende Mutation für autosomal-dominant vererbte ARVD5 auf Chromosom 3p25 wurde im Rahmen dieser Arbeit an 15 kanadischen Familien gesucht. Die ARVD5 ist als letale und geschlechtspezifische Erkrankung mit autosomal-dominantem Erbgang und vollständiger Penetranz definiert. Eine in unserer Arbeitsgruppe im Vorfeld durchgeführte Feinkartierung mittels STR- („short tandem repeat“) und Haplotyp-Mapping bildete die Grundlage der Genanalysen. Der genetische Locus konnte zudem durch den Nachweis genetischer Rekombinationsereignisse auf unter 2 cM eingeeengt werden. Als die den ARVC-Locus flankierenden STR-Marker wurden D3S3610 und REN49088 beschrieben.

In-silico-Analysen führten zur Identifikation von 14 potentiellen Kandidatengenen, welche mittels Polymerasekettenreaktion amplifiziert und untersucht wurden. Neben der Exons standen die Promotor-, 3'UTR-Bereiche und flankierenden Intronsequenzen im Vordergrund der Untersuchungen. Das Mutationsscreening wurde durch Southern-Blot-Experimente ergänzt. Zur Beurteilung der kardialen Expression einzelner Gene im Vergleich zu anderen Geweben wurden Northern-Blot-Analysen angefertigt.

Die molekulargenetischen Untersuchungen der 14 Kandidatengene führten zur Identifizierung diverser Spleißformen und Polymorphismen in kodierenden und nicht kodierenden Bereichen, welche zum Teil noch nicht beschrieben worden sind. Auch einige Insertionen und Deletionen unterschiedlichen Ausmaßes, teilweise mit Leserasterverschiebung der folgenden Sequenz, konnten identifiziert werden. Diese genetischen Veränderungen stellten sich allerdings als nicht krankheitsrelevant heraus. Die ARVD5 auslösende Mutation konnte zwar im Rahmen dieser Arbeit nicht gefunden werden, jedoch trugen unsere molekulargenetischen Untersuchungen zur Identifikation der krankheitsverursachenden Punktmutation (1073C→T, S358L) in einer

hochkonservierten transmembranären Domäne des *TMEM43-Gens* durch Merner und Kollegen (2008) bei. Derzeit ist über die Funktion des nicht desmosomalen Gens *TMEM43* wenig bekannt. Dennoch vermutet man eine Interaktion zwischen PPAR γ (adipogener Transkriptionsfaktor) und *TMEM43*, welche den fibrös-fettigen Ersatz des Myokardiums erklären könnte.

VI. Literaturverzeichnis

- Achsel T, Brahms H, Kastner B, et al. A doughnut-shaped heteromer of human Sm-like proteins binds to the 3'-end of U6 snRNA, thereby facilitating U4/U6 duplex formation in vitro. *EMBO J.* 1999; 18(20):5789-802.
- Ahmad F, Li D, Karibe A, et al. Localization of a gene responsible for arrhythmogenic right ventricular dysplasia to chromosome 3p23. *Circulation.* 1998; 98(25):2791-5.
- Alcalai R, Metzger S, Rosenheck S, et al. A recessive mutation in desmoplakin causes arrhythmogenic right ventricular dysplasia, skin disorder, and woolly hair. *J Am Coll Cardiol.* 2003; 42:319-27.
- Antos CL, McKinsey TA, Dreitz M, et al. Dose-dependent blockade to cardiomyocyte hypertrophy by histone deacetylase inhibitors. *J Biol Chem.* 2003; 278(31):28930-7.
- Aoki T, Okada N, Ishida M, et al. TIP120B: a novel TIP120-family protein that is expressed specifically in muscle tissues. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999; 261(3):911-6.
- Archer SY and Hodin RA. Histone acetylation and cancer. *Curr Opin Genet Dev.* 1999; 9(2):171-4.
- Asimaki A, Syrris P, Wichter T, et al. A novel dominant mutation in plakoglobin causes arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Am J Hum Genet.* 2007; 81(5):964-73.
- Auffermann W, Wichter T, Breithardt G, et al. Arrhythmogenic right ventricular disease: MR imaging vs. angiography. *AJR Am J Roentgenol.* 1993; 161:549-55.
- Basso C, Thiene G, Corrado D, et al. Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy: dysplasia, dystrophy, or myocarditis? *Circulation.* 1996; 94:983-91
- Bauce B, Nava A, Rampazzo A, et al. Familial effort polymorphic ventricular arrhythmias in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy map to chromosome 1q42-43. *Am J Cardiol.* 2000; 85:573-9.
- Beffagna G, Occhi G, Nava A, et al. Regulatory mutations in transforming growth factor- β 3 gene cause arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy type 1. *Cardiovasc Res.* 2005; 65(2):366-73.
- Bengtsson L, Otto H. LUMA interacts with emerin and influences its distribution at the inner nuclear membrane. *J Cell Sci.* 2008; 121(Pt 4):536-48.
- Berrios M, Meller VH, McConnell M, Fisher PA. *Drosophila* gp210, an invertebrate nuclear pore complex glycoprotein. *Eur J Cell Biol.* 1995; 67(1):1-7.
- Birnboim HC, Doly J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 1979; 7:1512-523.
- Bladt F, Tafuri A, Gelkop S, et al. Epidermolysis bullosa and embryonic lethality in mice lacking the multi-PDZ domain protein GRIP1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002; 99(10):6816-21.
- Bodoor K, Shaikh S, Salina D, et al. Sequential recruitment of NPC proteins to the nuclear periphery at the end of mitosis. *J Cell Sci.* 1999; 112(Pt 13):2253-64.
- Bond J, Sedmera D, Jourdan J, et al. Wnt11 and Wnt7a are up-regulated in association with differentiation of cardiac conduction cells in vitro and in vivo. *Dev Dyn.* 2003; 227(4):536-43.
- Booth HA, Holland PW. Annotation, nomenclature and evolution of four novel homeobox genes expressed in the human germ line. *Gene.* 2007; 387(1-2):7-14.

- Bowles NE, Ni J, Marcus F, Towbin JA. The detection of cardiotropic viruses in the myocardium of patients with arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol.* 2002; 39:892-5.
- Brückner K, Pablo Labrador J, Scheiffele P, et al. EphrinB ligands recruit GRIP family PDZ adaptor proteins into raft membrane microdomains. *Neuron.* 1999; 22(3):511-24.
- Burke AP, Farb A, Tashko G, Virmani R. Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy and fatty replacement of the right ventricular myocardium: Are they different diseases? *Circulation.* 1998; 97:1571-80.
- Carvajal-Huerta L. Epidermolytic palmoplantar keratoderma with woolly hair and dilated cardiomyopathy. *J Am Acad Dermatol.* 1998; 39:418-21.
- Chen Lf, Fischle W, Verdin E, Greene WC. Duration of nuclear NF-kappaB action regulated by reversible acetylation. *Science.* 2001; 293(5535):1653-7.
- Chen NH, Reith ME, Quick MW. Synaptic uptake and beyond: the sodium- and chloride-dependent neurotransmitter transporter family SLC6. *Pflugers Arch.* 2004; 447(5):519-31.
- Chorley BN, Wang X, Campbell MR, et al. Discovery and verification of functional single nucleotide polymorphisms in regulatory genomic regions: current and developing technologies. *Mutat Res.* 2008; 659(1-2):147-57.
- Clarke LA, Rebelo CS, Gonçalves J, et al. PCR amplification introduces errors into mononucleotide and dinucleotide repeat sequences. *Mol Pathol.* 2001; 54(5):351-3.
- Cohen M, Feinstein N, Wilson KL, Gruenbaum Y. Nuclear pore protein gp210 is essential for viability in HeLa cells and *Caenorhabditis elegans*. *Mol Biol Cell.* 2003; 14(10):4230-7.
- Colston JT, Chandresekan B, Freeman GL. Expression of apoptosis-related proteins in experimental myocarditis. *Cardiovasc Res.* 1998; 38:158-68.
- Coonar AS, Protonotarios N, Tsatsopoulou A, et al. Gene for arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy with diffuse nonepidermolytic palmoplantar keratoderma and woolly hair (Naxos disease) maps to 17q21. *Circulation* 1998; 97(20):2049-58.
- Corrado D, Basso C, Schiavon M, Thiene G. Screening for hypertrophic cardiomyopathy in young athletes. *N Engl J Med.* 1998; 339:364-9.
- Corrado D, Basso C, Thiene G. Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy: diagnosis, prognosis, and treatment. *Heart* 2000; 83:588-95.
- Corrado D, Basso C, Thiene G, et al. Spectrum of clinicopathologic manifestations of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy/dysplasia: a multicenter study. *J Am Coll Cardiol.* 1997; 30:1512-20
- Corrado D, Fontaine G, Marcus FI, et al., for the study group on arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy of the working groups on myocardial and pericardial disease and arrhythmias of the European Society of Cardiology and of the Scientific Council on Cardiomyopathies of the World Heart Federation. Arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy: need for an international registry. *Circulation.* 2000; 101:e101-e106.
- Corrado D, Thiene G, Nava A, et al. Sudden death in young competitive athletes: clinicopathologic correlation in 22 cases. *Am J Med.* 1990; 89:588-96.
- Daliento L, Rizzoli G, Thiene G, et al. Diagnostic accuracy of right ventriculography in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Am J Cardiol.* 1990; 66:7741-5.

- Dalla Volta S, Battaglia G, Zerbini E. Auricularization of right ventricular pressure curve. *Am Heart J* 1961; 61:25-33.
- De Luca A, Pierno S, Camerino DC. Effect of taurine depletion on excitation-contraction coupling and Cl⁻ conductance of rat skeletal muscle. *Eur J Pharmacol.* 1996; 296(2):215-22.
- Dong H, O'Brien RJ, Fung ET, et al. GRIP: a synaptic PDZ domain-containing protein that interacts with AMPA receptors. *Nature.* 1997; 386(6622):279-84.
- Dong H, Zhang P, Song I, et al. Characterization of the glutamate receptor-interacting proteins GRIP1 and GRIP2. *J Neurosci.* 1999; 19(16):6930-41.
- Dungan WT, Garson A Jr, Gillette PC. Arrhythmogenic right ventricular dysplasia: a cause of ventricular tachycardia in children with apparently normal hearts. *Am Heart J.* 1981; 102:745-50.
- Eley DW, Lake N, ter Keurs HE. Taurine depletion and excitation-contraction coupling in rat myocardium. *Circ Res.* 1994; 74(6):1210-9.
- Eriksson C, Rustom C, Hallberg E. Dynamic properties of nuclear pore complex proteins in gp210 deficient cells. *FEBS Lett.* 2004; 572(1-3):261-5.
- Ewald A, Kossner U, Scheer U, Dabauvalle MC. A biochemical and immunological comparison of nuclear and cytoplasmic pore complexes. *J Cell Sci.* 1996; 109 (Pt 7):1813-24.
- Favreau C, Bastos R, Cartaud J, et al. Biochemical characterization of nuclear pore complex protein gp210 oligomers. *Eur J Biochem.* 2001; 268(14):3883-9.
- Favreau C, Worman HJ, Wozniak RW, et al. Cell cycle-dependent phosphorylation of nucleoporins and nuclear pore membrane protein Gp210. *Biochemistry.* 1996; 35(24):8035-44.
- Feinberg AP, Vogelstein B. A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.* 1983; 132:6-13.
- Fontaine G, Fontaliran F, Frank R. Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathies: clinical forms and main differential diagnoses (editorial). *Circulation.* 1998; 97:1532-5.
- Fontaine G, Guiraudon G, Frank R, et al. Stimulation studies and epicardial mapping in ventricular tachycardia: study of mechanisms and selection for surgery. In *reentrant arrhythmias*. Edited by Kulbertus HE, Lancaster: MTP Publishing, 1977; 334-50.
- Fontaliran F, Fontaine G, Fillette F, et al. Nosologic frontiers of arrhythmogenic dysplasia: quantitative variations of normal adipose tissue of the right heart ventricle. *Arch Mal Coeur Vaiss.* 1991; 84:33-8.
- Fung WH, Sanderson JE. Clinical profile of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy in Chinese patients. *Int J Cardiol.* 2001; 81:9-18.
- Gallicano GI, Kouklis P, Bauer C, et al. Desmoplakin is required early in development for assembly of desmosomes and cytoskeletal linkage. *J Cell Biol.* 1998; 143:2009-2022.
- Gao L, Cueto MA, Asselbergs F, Atadja P. Cloning and functional characterization of HDAC11, a novel member of the human histone deacetylase family. *J Biol Chem.* 2002; 277:25748-55.
- Garcia-Gras E, Lombardi R, Giocondo MJ, et al. Suppression of canonical Wnt/beta-catenin signaling by nuclear plakoglobin recapitulates phenotype of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *J Clin Invest.* 2006; 116(7):2012-21.
- Gerace L, Ottaviano Y, Kondor-Koch C. Identification of a major polypeptide of the nuclear pore complex. *J Cell Biol.* 1982; 95(3):826-37.

- Gerull B, Heuser A, Wichter T, et al. Mutations in the desmosomal protein plakophilin-2 are common in arrhythmic right ventricular cardiomyopathy. *Nat Genet.* 2004; 36(11):1162-4.
- Gilliland G, Perrin S, Blanchard K, Bunn HF. Analysis of cytokine mRNA and DNA: detection and quantitation by competitive polymerase chain reaction. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990; 87(7):2725-9.
- Girard F, Fontaine G, Fontaliran F, et al. Catastrophic global heart failure in a case of non arrhythmic right ventricular dysplasia. *Heart Vessels* 1997; 12:152-4.
- Greber UF, Senior A, Gerace L. A major glycoprotein of the nuclear pore complex is a membrane-spanning polypeptide with a large luminal domain and a small cytoplasmic tail. *EMBO J.* 1990; 9(5):1495-502.
- Gregoret IV, Lee YM, Goodson HV. Molecular evolution of the histone deacetylase family: functional implications of phylogenetic analyses. *J Mol Biol.* 2004; 338(1):17-31.
- Grossmann KS, Grund C, Huelsken J, et al. Requirement of plakophilin 2 for heart morphogenesis and cardiac junction formation. *J Cell Biol.* 2004; 167(1):149-60.
- Grumbach IM, Heim A, Vonhof S, et al. Coxsackievirus genome in myocardium of patients with arrhythmic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy. *Cardiology* 1998; 89(4):241-5.
- Grunstein M, Hogness DS. Colony hybridization: A method for the isolation of cloned DNAs that contain a specific gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1975; 72:3961-5.
- Hamid MS, Norman M, Quraishi A, et al. Prospective evaluation of relatives for familial arrhythmic right ventricular cardiomyopathy/dysplasia reveals a need to broaden diagnostic criteria. *J Am Coll Cardiol.* 2002; 40(8):1445-50.
- Heuser A, Plovie ER, Ellinor PT, et al. Mutant desmocollin-2 causes arrhythmic right ventricular cardiomyopathy. *Am J Hum Genet.* 2006; 79(6):1081-8.
- Hirabayashi Y, Itoh Y, Tabata H, et al. The Wnt/beta-catenin pathway directs neuronal differentiation of cortical neural precursor cells. *Development.* 2004; 131(12):2791-801.
- Hofmann S, Rothbauer U, Mühlenbein N, et al. Functional and mutational characterization of human MIA40 acting during import into the mitochondrial intermembrane space. *J Mol Biol.* 2005; 353(3):517-28.
- Huber CG, Oefner PJ, Bonn GK. High-resolution liquid chromatography of oligonucleotides on nonporous alkylated styrene-divinylbenzene copolymers. *Anal Biochem.* 1993; 212:351-358.
- Hunt R, Sauna ZE, Ambudkar SV, et al. Silent (synonymous) SNPs: should we care about them? *Methods Mol Biol.* 2009; 578:23-39.
- Ikegawa S, Kumano Y, Okui K, et al. Isolation, characterization and chromosomal assignment of the human WNT7A gene. *Cytogenet Cell Genet.* 1996; 74(1-2):149-52.
- Johnson RL, Tabin CJ. Molecular models for vertebrate limb development. *Cell.* 1997; 90(6):979-90.
- Kaplan SR, Gard JJ, Carvajal-Huerta L, et al. Structural and molecular pathology of the heart in Carvajal syndrome. *Cardiovasc Pathol.* 2004; 13:26-32.
- Kayser HW, van der Wall EE, Sivananthan MU, et al. Diagnosis of arrhythmic right ventricular dysplasia: a review. *Radiographics.* 2002; 22(3):639-50.
- Kowalczyk AP, Bornslaeger EA, Borgwardt JE, et al. The amino-terminal domain of desmoplakin binds to plakoglobin and clusters desmosomal cadherin-plakoglobin complexes. *J Cell Biol.* 1997; 139:773-784.

- Kraemer KH, Lee MM, Andrews AD, Lambert WC. The role of sunlight and DNA repair in melanoma and nonmelanoma skin cancer. The xeroderma pigmentosum paradigm. *Arch Dermatol.* 1994; 130(8):1018-21.
- Kuhl A, Melberg A, Meinel E, et al. Myofibrillar myopathy with arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy 7: corroboration and narrowing of the critical region on 10q22.3. *Eur J Hum Genet.* 2008; 16(3):367-73.
- Kutko MC, Glick RD, Butler LM, et al. Histone deacetylase inhibitors induce growth suppression and cell death in human rhabdomyosarcoma in vitro. *Clin Cancer Res.* 2003; 9(15):5749-55.
- Lake N, de Roode M, Nattel S. Effects of taurine depletion on rat cardiac electrophysiology: in vivo and in vitro studies. *Life Sci.* 1987; 40(10):997-1005.
- Laurent M, Descaves C, Biron Y, et al. Familial form of arrhythmogenic right ventricular dysplasia. *Am Heart J* 1987; 113:827-9.
- Leask A and Abraham DJ. TGF-beta signalling and the fibrotic response. *FASEB J* 2004; 18:816-27.
- Lee C, Wang Q. Bioinformatics analysis of alternative splicing. *Brief Bioinform.* 2005; 6(1):23-33.
- Lemay DG, Hwang DH. Genome-wide identification of peroxisome proliferator response elements using integrated computational genomics. *J Lipid Res.* 2006; 47(7):1583-7.
- Leung CL, Green KJ, Liem RK. Plakins: a family of versatile cytolinker proteins. *Trends Cell Biol.* 2002; 12:37-45
- Li D, Ahmad F, Gardner MJ, et al. The locus of a novel gene responsible for arrhythmogenic right-ventricular dysplasia characterized by early onset and high penetrance maps to chromosome 10p12-p14. *Am J Hum Genet.* 2000; 66(1):148-56.
- Li H, Wang J, Ma X, Sklar J. Gene fusions and RNA trans-splicing in normal and neoplastic human cells. *Cell Cycle.* 2009; 8(2):218-22.
- Li J, Wang J, Wang J, et al. Both corepressor proteins SMRT and N-CoR exist in large protein complexes containing HDAC3. *EMBO J.* 2000; 19(16):4342-50.
- Lindström L, Nylander E, Larsson H, Wranné B. Left ventricular involvement in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy - a scintigraphic and echocardiographic study. *Clin Physiol Funct Imaging.* 2005; 25(3):171-7.
- Link MS, Wang PJ, Haugh CJ, et al. Arrhythmogenic right ventricular dysplasia: clinical results with implantable cardioverter defibrillators. *J Interv Card Electrophysiol.* 1997; 1(1):41-8.
- Lobo FV, Heggveit HA, Butany J, et al. Right ventricular dysplasia: morphological findings in 13 cases. *Can J Cardiol.* 1992; 8:261-8.
- Lobo FV, Silver MD, Butany J, Heggveit HA. Left ventricular involvement in right ventricular dysplasia/cardiomyopathy. *Can J Cardiol.* 1999; 15(11):1239-47.
- Luo J, Su F, Chen D, et al. Deacetylation of p53 modulates its effect on cell growth and apoptosis. *Nature.* 2000; 408(6810):377-81.
- Mallat, Z, Tedgui A, Fontaliran F, et al. Evidence of apoptosis in arrhythmogenic right ventricular dysplasia. *N Engl J Med.* 1996; 335:1190-6.
- Mans BJ, Anantharaman V, Aravind L, Koonin EV. Comparative genomics, evolution and origins of the nuclear envelope and nuclear pore complex. *Cell Cycle.* 2004; 3(12):1612-37.

- Marcus F, Towbin JA, Zareba W, et al. Arrhythmogenic right ventricular dysplasia /cardiomyopathy (ARVD/C). A multidisciplinary study: design and protocol. *Circulation*. 2003; 107:2975-8.
- Marcus FI. Is arrhythmogenic right ventricular dysplasia, Uhl's anomaly, and right ventricular outflow tract tachycardia a spectrum of the same disease. *Cardiol Rev*. 1997; 5:25-9.
- Marcus FI, and Fontaine G. Arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy: a review. *Pacing Clin Electrophysiol*. 1995; 18(6):1298-314.
- Marcus FI, Fontaine GH, Guiraudon G, et al. Right ventricular dysplasia : a report of 24 adult cases. *Circulation*. 1982; 65(2):384-98.
- Marian AJ, Roberts R. Recent advances in the molecular genetics of hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation*. 1995; 92:1336-47.
- Maron BJ, Shirani J, Poliac LC, et al. Sudden death in young competitive athletes: Clinical, demographic, and pathological profiles. *JAMA*. 1996; 276(3):199-204.
- Marzio G, Wagener C, Gutierrez MI, et al. E2F family members are differentially regulated by reversible acetylation. *J Biol Chem*. 2000; 275(15):10887-92.
- Matolweni LO, Bardien S, Rebello G, et al. Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy type 6 (ARVC6): support for the locus assignment, narrowing of the critical region and mutation screening of three candidate genes. *BMC Med Genet*. 2006; 28;7:29.
- Matsuo S, Sato Y, Nakae I, et al. Left ventricular involvement in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy demonstrated by multidetector-row computed tomography. *Int J Cardiol*. 2007; 14;115(3):e129-31.
- McKenna WJ, Thiene G, Nava A, et al. Diagnosis of arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy. Task Force of the Working Group Myocardial and Pericardial Disease of the European Society of Cardiology and of the Scientific Council on Cardiomyopathies of the International Society and Federation of Cardiology. *Br Heart J*. 1994; 71(3):215-8.
- McKinsey TA, Zhang CL, Olson EN. MEF2: a calcium-dependent regulator of cell division, differentiation and death. *Trends Biochem. Sci*. 2002; 27:40-7.
- McKoy G, Protonotarios N, Crosby A, et al. Identification of a deletion in plakoglobin in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy with palmoplantar keratoderma and woolly hair (Naxos disease). *Lancet*. 2000; 355(9221):2119-24.
- McMahon AP, Gavin BJ, Parr B, et al. The Wnt family of cell signalling molecules in postimplantation development of the mouse. *Ciba Found Symp*. 1992; 165:199-212; discussion 212-8.
- Melberg A, Oldfors A, Blomstrom-Lundqvist C, et al. Autosomal dominant myofibrillar myopathy with arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy linked to chromosome 10q. *Ann Neurol*. 1999; 46(5):684-92.
- Menghetti L, Basso C, Nava A, et al. Spin-echo nuclear magnetic resonance for tissue characterisation in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Heart* 1996; 76:467-70.
- Merner ND, Hodgkinson KA, Haywood AF, Connors S, French VM, Drenckhahn JD, Kupprion C, Ramadanova K, Thierfelder L, et al. Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy type 5 is a fully penetrant, lethal arrhythmic disorder caused by a missense mutation in the TMEM43 gene. *Am J Hum Genet*. 2008; 82(4):809-21.
- Miosge N, Gotz W, Sasaki T, et al. The extracellular matrix proteins fibulin-1 and fibulin-2 in the early human embryo. *Histochem J*. 1996; 28(2):109-16.

- Movsowitz C, Schwartzman D, Callans DJ, et al. Idiopathic right ventricular outflow tract tachycardia: narrowing the anatomic location for successful ablation. *Am Heart J.* 1996; 131:930-6.
- Muratori L, Granito A, Muratori P, et al. Antimitochondrial antibodies and other antibodies in primary biliary cirrhosis: diagnostic and prognostic value. *Clin Liver Dis.* 2008; 12(2):261-76.
- Nagy L, Kao HY, Chakravarti D, et al. Nuclear receptor repression mediated by a complex containing SMRT, mSin3A, and histone deacetylase. *Cell.* 1997; 89(3):373-80.
- Nakamura T, Sano M, Songyang Z, Schneider MD. A Wnt- and beta -catenin-dependent pathway for mammalian cardiac myogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003; 100(10):5834-9.
- Nava A, Bauce B, Basso C, et al. Clinical profile and long-term follow-up of 37 families with arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol.* 2000; 36:2226-33.
- Nava A, Canciani B, Thiene G, et al. Analysis of the mode of transmission of right ventricular dysplasia. *Arch Mal Cœur Vaiss.* 1990; 83(7):923-8.
- Nava A, Scognamiglio R, Thiene G, et al. A polymorphic form of familial arrhythmogenic right ventricular dysplasia. *Am J Cardiol.* 1987; 59(15):1405-9.
- Nava A, Thiene G, Canciani B, et al. Clinical profile of concealed form of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy presenting with apparently idiopathic ventricular arrhythmias. *Int J Cardiol.* 1992; 35:195-206.
- Nava A, Thiene G, Canciani B, et al. Familial occurrence of right ventricular dysplasia: a study involving nine families. *J Am Coll Cardiol* 1988; 12(5):1222-8.
- Nemec J, Edwards BS, Osborn MJ, Edwards WD. Arrhythmogenic right ventricular dysplasia masquerading as dilated cardiomyopathy. *Am J Cardiol.* 1999; 84:237-9.
- Norgett EE, Hatsell SJ, Carvajal-Huerta L, et al. Recessive mutation in desmoplakin disrupts desmoplakin-intermediate filament interactions and causes dilated cardiomyopathy, woolly hair and keratoderma. *Hum Mol Genet* 2000; 9:2761-6.
- Norman M, Simpson M, Mogensen J, et al. Novel mutation in desmoplakin causes arrhythmogenic left ventricular cardiomyopathy. *Circulation.* 2005; 112(5):636-42.
- Nusse R, Varmus HE. Many tumors induced by the mouse mammary tumor virus contain a provirus integrated in the same region of the host genome. *Cell.* 1982; 31(1):99-109.
- Nymark P, Lindholm PM, Korpela MV, et al. Gene expression profiles in asbestos-exposed epithelial and mesothelial lung cell lines. *BMC Genomics.* 2007; 8:62.
- Olin AI, Morgelin M, Sasaki T, et al. The proteoglycans aggrecan and versican form networks with fibulin-2 through their lectin domain binding. *J Biol Chem.* 2001; 276(2):1253-61.
- Olson TM, Keating MT. Mapping a cardiomyopathy locus to chromosome 3p22-25. *J Clin Invest.* 1996; 97:528-32.
- Olsson M, Ekblom M, Fecker L, et al. cDNA cloning and embryonic expression of mouse nuclear pore membrane glycoprotein 210 mRNA. *Kidney Int.* 1999; 56(3):827-38.
- Olsson M, Schéele S, Ekblom P. Limited expression of nuclear pore membrane glycoprotein 210 in cell lines and tissues suggests cell-type specific nuclear pores in metazoans. *Exp Cell Res.* 2004; 292(2):359-70.
- Onischenko EA, Crafoord E, Hallberg E. Phosphomimetic mutation of the mitotically phosphorylated serine 1880 compromises the interaction of the transmembrane nucleoporin gp210 with the nuclear pore complex. *Exp Cell Res.* 2007; 313(12):2744-51.

- Pan TC, Sasaki T, Zhang RZ, et al. Structure and expression of fibulin-2, a novel extracellular matrix protein with multiple EGF-like repeats and consensus motifs for calcium binding. *J Cell Biol.* 1993; 123(5):1269-77.
- Parr BA, McMahon AP. Sexually dimorphic development of the mammalian reproductive tract requires Wnt-7a. *Nature.* 1998; 395(6703):707-10.
- Pawel BR, Donner RM. Sudden death in childhood due to right ventricular dysplasia: Report of two cases. *Pediatr Pathol.* 1994; 14:987-95.
- Pilichou K, Nava A, Basso C, et al. Mutations in desmoglein-2 gene are associated with arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Circulation.* 2006; 113(9):1171-9.
- Pinamonti B, Pagnan L, Bussani R, et al. Right ventricular dysplasia with biventricular involvement. *Circulation.* 1998; 98(18):1943-5.
- Protonotarios N et Tsatsopoulou A. Naxos disease and Carvajal syndrome: cardiocutaneous disorders that highlight the pathogenesis and broaden the spectrum of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Cardiovasc Pathol.* 2004; 13:185-194.
- Protonotarios N, Tsatsopoulou A, Anastasakis A, et al. Genotype-phenotype assessment in autosomal recessive arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy (Naxos disease) caused by a deletion in plakoglobin. *J Am Coll Cardiol.* 2001; 38(5):1477-84.
- Protonotarios N, Tsatsopoulou A, Patsourakos P, et al. Cardiac abnormalities in familial palmoplantar keratosis. *Br Heart J.* 1986; 56(4):321-6.
- Ramamoorthy S, Leibach FH, Mahesh VB, et al. Functional characterization and chromosomal localization of a cloned taurine transporter from human placenta. *Biochem. J.* 1994; 300:893-900.
- Rampazzo A, Nava A, Danieli GA, et al. The gene for arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy maps to chromosome 14q23-q24. *Mol Genet.* 1994; 3(6):959-62.
- Rampazzo A, Nava A, Erne P, et al. A new locus for arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy (ARVD2) maps to chromosome 1q42-q43. *Hum Mol Genet.* 1995; 4(11):2151-4.
- Rampazzo A, Nava A, Malacrida S, et al. Mutation in human desmoplakin domain binding to plakoglobin causes a dominant form of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Am J Hum Genet.* 2002; 71(5):1200-6.
- Rampazzo A, Nava A, Miorin M, Fonderico P, Pope B, Tiso N, Livolsi B, Zimbello R, Thiene G, Danieli GA. ARVD4, a new locus for arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy, maps to chromosome 2 long arm. *Genomics.* 1997; 45(2):259-63.
- Reinhardt DP, Sasaki T, Dzamba BJ, et al. Fibrillin-1 and fibulin-2 interact and are colocalized in some tissues. *J Biol Chem.* 1996; 271(32):19489-96.
- Richardson P, McKenna W, Bristow M, et al. Report of the 1995 World Health Organization/International Society and Federation of Cardiology Task Force on the Definition and Classification of cardiomyopathies. *Circulation.* 1996; 93(5):841-2.
- Richon VM, Emiliani S, Verdin E, et al. A class of hybrid polar inducers of transformed cell differentiation inhibits histone deacetylases. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1998; 95(6):3003-7.
- Ruiz P, Brinkmann V, Ledermann B, et al. Targeted mutation of plakoglobin in mice reveals essential functions of desmosomes in the embryonic heart. *J Cell Biol.* 1996; 135(1):215-25.
- Salgado-Garrido J, Bragado-Nilsson E, Kandels-Lewis S, Seraphin B. Sm and Sm-like proteins assemble in two related complexes of deep evolutionary origin. *EMBO J.* 1999; 18(12):3451-62.

- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd Edition; Cold Spring Harbor Laboratory Press; Cold Spring Harbor, New York, 1989.
- Sands AT, Abuin A, Sanchez A, et al. High susceptibility to ultraviolet-induced carcinogenesis in mice lacking XPC. *Nature*. 1995; 377(6545):162-5.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-termination inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1977; 74:5463-7.
- Sasaki T, Gohring W, Miosge N, et al. Tropoelastin binding to fibulins, nidogen-2 and other extracellular matrix proteins. *FEBS Lett*. 1999; 460(2):280-4.
- Saunders N, Dicker A, Popa C, et al. Histone deacetylase inhibitors as potential anti-skin cancer agents. *Cancer Res*. 1999; 59(2):399-404.
- Schmitt TJ, Robinson ML, Doyle J. Single Nucleotide Polymorphism (SNP), Insertion & Deletion Detection on the WAVE® Nucleic Acid Fragment Analysis System. Transgenomic Inc. Application Note 112. 2000.
- Schnittler HJ, Puschel B, Drenckhahn D. Role of cadherins and plakoglobin in interendothelial adhesion under resting conditions and shear stress. *Am J Physiol* 1997; 273:H2396-405.
- Selcen D, Engel AG. Mutations in ZASP define a novel form of muscular dystrophy in humans. *Ann Neurol*. 2005; 57(2):269-76.
- Severini GM, Krajcinovic M, Pinamonti B, et al. A new locus for arrhythmogenic right ventricular dysplasia on the long arm of chromosome 14. *Genomics*. 1996; 31(2):193-200.
- Shastry BS. SNPs: impact on gene function and phenotype. *Methods Mol Biol*. 2009; 578:3-22.
- Shirani J, Berezowski K, Roberts WC. Quantitative measurement of normal and excessive (cor adiposum) subepicardial adipose tissue, its clinical significance, and its effect on electrocardiographic QRS voltage. *Am J Cardiol*. 1995; 76:414-8.
- Simpson MA, Mansour S, Ahnood D, et al. Homozygous mutation of desmocollin-2 in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy with mild palmoplantar keratoderma and woolly hair. *Cardiology*. 2009; 113(1):28-34.
- Smith EA and Fuchs E. Defining the interactions between intermediate filaments and desmosomes. *J Cell Biol*. 1998; 141:1229-1241.
- Southern EM. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol*. 1975; 98:503-17.
- Sporn MB and Roberts AB. Transforming growth factor-beta: recent progress and new challenges. *J Cell Biol*. 1992; 119:1017-21.
- Stavru F, Nautrup-Pedersen G, Cordes VC, Görlich D. Nuclear pore complex assembly and maintenance in POM121- and gp210-deficient cells. *J Cell Biol*. 2006; 173(4):477-83.
- Stegmüller J, Werner H, Nave KA, Trotter J. The proteoglycan NG2 is complexed with alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA) receptors by the PDZ glutamate receptor interaction protein (GRIP) in glial progenitor cells. Implications for glial-neuronal signaling. *J Biol Chem*. 2003; 278(6):3590-8.
- Steriotis AK, Bauce B, Daliento L, et al. Electrocardiographic pattern in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Am J Cardiol*. 2009; 103(9):1302-8.

- Syrris P, Ward D, Asimaki A, et al. Desmoglein-2 mutations in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy: a genotype-phenotype characterization of familial disease. *Eur Heart J*. 2007; 28(5):581-8.
- Syrris P, Ward D, Asimaki A, et al. Clinical expression of plakophilin-2 mutations in familial arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Circulation*. 2006a; 113(3):356-64.
- Syrris P, Ward D, Evans A, et al. Arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy associated with mutations in the desmosomal gene desmocollin-2. *Am J Hum Genet*. 2006b; 79(5):978-84.
- Takamiya K, Kostourou V, Adams S, et al. A direct functional link between the multi-PDZ domain protein GRIP1 and the Fraser syndrome protein Fras1. *Nat Genet*. 2004; 36(2):172-7.
- Takamiya K, Mao L, Hagan RL, Linden DJ. The glutamate receptor-interacting protein family of GluR2-binding proteins is required for long-term synaptic depression expression in cerebellar Purkinje cells. *J Neurosci*. 2008; 28(22):5752-5.
- Thiene G, Basso C. Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy: An update. *Cardiovasc Pathol*. 2001; 10:109-17.
- Thiene G, Basso C, Danieli GA, et al. Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy: a still underrecognized clinic entity. *Trends Cardiovasc Med*. 1997; 7:84-90.
- Thiene G, Corrado D, Nava A, et al. Right ventricular cardiomyopathy: is there evidence of an inflammatory aetiology? *Eur Heart J* 1991; 12:22-5.
- Thiene G, Nava A, Corrado D, et al. Right ventricular cardiomyopathy and sudden death in young people. *N Engl J Med*. 1988; 318:129-33.
- Tiso N, Stephan DA, Nava A, et al. Identification of mutations in the cardiac ryanodine receptor gene in families affected with arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy type 2 (ARVD2). *Hum Mol Genet*. 2001; 10(3): 189-94.
- Tsuda T, Wang H, Timpl R, Chu ML. Fibulin-2 expression marks transformed mesenchymal cells in developing cardiac valves, aortic arch vessels and coronary vessels. *Dev. Dyn*. 2001; 222:89-100.
- Turrini P, Angelini A, Thiene G, et al. Late potentials and ventricular arrhythmias in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Am J Cardiol*. 1999; 83:1214-9.
- Uchida S, Kwon HM, Yamauchi A, et al. Molecular cloning of the cDNA for an MDCK cell Na(+)- and Cl(-)-dependent taurine transporter that is regulated by hypertonicity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992; 89(17):8230-4.
- Utani A, Nomizu M, Yamada Y. Fibulin-2 binds to the short arms of laminin-5 and laminin-1 via conserved amino acid sequences. *J Biol Chem*. 1997; 272(5):2814-20.
- Valente M, Calabrese F, Angelini A, et al. In vivo evidence of apoptosis in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Am J Pathol*. 1998; 152:479-84.
- van den Wyngaert I, de Vries W, Kremer A, et al. Cloning and characterization of human histone deacetylase 8. *FEBS Lett*. 2000; 478(1-2):77-83.
- van Steeg H, Kraemer KH. Xeroderma pigmentosum and the role of UV-induced DNA damage in skin cancer. *Mol Med Today*. 1999; 5(2):86-94.
- van Tintelen JP, Entius MM, Bhuiyan ZA, et al. Plakophilin-2 mutations are the major determinant of familial arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy. *Circulation*. 2006; 113(13):1650-8.
- Voelter-Mahlknecht S, Ho AD, Mahlkecht U. Chromosomal organization and localization of the novel class IV human histone deacetylase 11 gene. *Int J Mol Med*. 2005; 16(4):589-98.

- Warrell RP Jr, He LZ, Richon V, et al. Therapeutic targeting of transcription in acute promyelocytic leukemia by use of an inhibitor of histone deacetylase. *J Natl Cancer Inst.* 1998; 90(21):1621-5.
- Warskulat U, Flögel U, Jacoby C, et al. Taurine transporter knockout depletes muscle taurine levels and results in severe skeletal muscle impairment but leaves cardiac function uncompromised. *FASEB J.* 2004; 18(3):577-9.
- Warskulat U, Heller-Stilb B, Oermann E, et al. Phenotype of the taurine transporter knockout mouse. *Methods Enzymol.* 2007; 428:439-58.
- Westerman BA, Poutsma A, Steegers EA, Oudejans CB. C2360, a nuclear protein expressed in human proliferative cytotrophoblasts, is a representative member of a novel protein family with a conserved coiled coil-helix-coiled coil-helix domain. *Genomics.* 2004; 83(6):1094-104.
- Wichter T, Böcker D, Borggreffe M, et al. Cardioverter-defibrillatory therapy. In: Nava A, Rossi L, Thiene G, eds. *Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy-dysplasia.* Amsterdam, Netherlands: Elsevier. 1997a 364-75.
- Wichter T, Borggreffe M, Haverkamp W, et al. Efficacy of antiarrhythmic drugs in patients with arrhythmogenic right ventricular disease: Results in patients with inducible and noninducible ventricular tachycardia. *Circulation.* 1992; 86:29-37.
- Wichter T, Hindricks G, Kottkamp H, et al. Catheter ablation of ventricular tachycardia. In: Nava A, Rossi L, Thiene G, eds. *Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy-dysplasia.* Amsterdam, Netherlands: Elsevier 1997b 376-91.
- Wichter T, Hindricks G, Lerch H, et al. Regional myocardial sympathetic dysinnervation in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy: An analysis using ¹²³I-meta-iodobenzylguanidine scintigraphy. *Circulation.* 1994; 89:667-83.
- Wichter T, Schafers M, Rhodes CG, et al. Abnormalities of cardiac sympathetic innervation in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy: Quantitative assessment of presynaptic norepinephrine reuptake and postsynaptic beta-adrenergic receptor density with positron emission tomography. *Circulation.* 2000; 101:1552-8.
- Wiesfeld AC, Crijns HJ, Van Dijk RB, et al. Potential role of endomyocardial biopsy in the clinical characterization of patients with idiopathic ventricular fibrillation: arrhythmogenic right ventricular dysplasia – an undervalued cause. *Am Heart J* 1994; 127(5):1421-4.
- Woods CG, Stricker S, Seemann P, et al. Mutations in WNT7A cause a range of limb malformations, including Fuhrmann syndrome and Al-Awadi/Raas-Rothschild/Schinzel phocomelia syndrome. *Am J Hum Genet.* 2006; 79(2):402-8.
- Wozniak RW, Bartnik E, Blobel G. Primary structure analysis of an integral membrane glycoprotein of the nuclear pore. *J Cell Biol.* 1989; 108(6):2083-92.
- Wyszynski M, Valtchanoff JG, Naisbitt S, et al. Association of AMPA receptors with a subset of glutamate receptor-interacting protein in vivo. *J Neurosci.* 1999; 19(15):6528-37.
- Xiao W, Oefner PJ. Denaturing high-performance liquid chromatography: A review. *Hum Mutat.* 2001; 17(6):439-74.
- Xie J, Marusich MF, Souda P, et al. The mitochondrial inner membrane protein mitofilin exists as a complex with SAM50, metaxins 1 and 2, coiled-coil-helix coiled-coil-helix domain-containing protein 3 and 6 and DnaJC11. *FEBS Lett.* 2007; 581(18):3545-9.
- Yamamoto T, El-Hayek R, Ikemoto N. Postulated role of interdomain interaction within the ryanodine receptor in calcium channel regulation. *J Biol Chem.* 2000; 275:11618-25.

LITERATURVERZEICHNIS

Yang WM, Yao YL, Sun JM, et al. Isolation and characterization of cDNAs corresponding to an additional member of the human histone deacetylase gene family. *J Biol Chem.* 1997; 272(44):28001-7.

Zhang CL, McKinsey TA, Chang S, et al. Class II histone deacetylases act as signal-responsive repressors of cardiac hypertrophy. *Cell.* 2002; 110(4):479-88.

Zhang HY, Chu ML, Pan TC, et al. Extracellular matrix protein fibulin-2 is expressed in the embryonic endocardial cushion tissue and is a prominent component of valves in adult heart. *Dev. Biol.* 1995; 167:18-26.

Zhang HY, Kluge M, Timpl R, et al. The extracellular matrix glycoproteins BM-90 and tenascin are expressed in the mesenchyme at sites of endothelial-mesenchymal conversion in the embryonic mouse heart. *Differentiation.* 1993; 52:211-220.

Zhang QH, Ye M, Wu XY, et al. Cloning and functional analysis of cDNAs with open reading frames for 300 previously undefined genes expressed in CD34+ hematopoietic stem/progenitor cells. *Genome Res.* 2000; 10(10):1546-60.

Zhang RZ, Pan TC, Zhang ZY, et al. Fibulin-2 (FBLN2): human cDNA sequence, mRNA expression, and mapping of the gene on human and mouse chromosomes. *Genomics.* 1994; 22(2):425-30.

VII. Klone und Sequenzen

7.1 Genomische Klone

RP11-708D1	GI 13384361
RP11-320K24	GI 13378378
AY131066	GI 21914793
CTD-2059M21	GI 24796711
RP11-14A10	GI 24796714
RP11-16L19	GI 24796718
RP11-449E21	GI 24796740
RP11-220D14	GI 13384346
RP11-588H7	GI 24796745
NG_008088	GI 193082964
RP11-470I10	GI 12084025

7.2 Kodierende Sequenzen

NM_016474	GI 108773807
AF151046	GI 7106813
NM_014463	GI 7657314
BC016620	GI 16741635
XM_211865	GI 27478241
BF508215	GI 11591513
XM_087417	GI 18555966
NM_003043	GI 110082729
NM_024827	GI 13376227
NM_024827.3	GI 227430412
NM_001136041	GI 227430411
NM_024923	GI 27477133
NM_001080423	GI 122937248
XM_042936	GI 27478249
NM_004625	GI 34328912
NM_001004019	GI 51873052
NM_001165035	GI 259013546
NM_001998	GI 51873054

NM_004628.4

GI 224809294

NM_001145769

GI 224809301

7.3 Proteine

NP_003034

GI 54607094

NP_079103

GI 13376228

NP_079199

GI 27477134

NP_004616

GI 17505191

NP_001004019

GI 51873053

VIII. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildungen
ADP	Adenosindiphosphat
ALEX	alternatives Exon
ALSF	alternative Spleißform
AMPA	α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-Propionsäure
APS	Ammoniumpersulfat
ARVC	Arrhythmogene rechtsventrikuläre Kardiomyopathie
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
°C	Grad Celsius
C3orf19-Gen	„chromosome 3 open reading frame 19“
C3orf20-Gen	„chromosome 3 open reading frame 20“
cDNA	„copy“ oder komplementäre DNA
CHCHD4	„coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain containing 4“
Chloramp	Chloramphenicol
CTP	Cytosintriphosphat
Da	Dalton
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
ddATP	Didesoxyadenosintriphosphat
ddCTP	Didesoxycytidintriphosphat
ddGTP	Didesoxyguanosintriphosphat
ddH ₂ O	bidestilliertes Wasser
ddNTP	Didesoxynukleosidtriphosphat
ddTTP	Didesoxythymidintriphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
dH ₂ O	destilliertes Wasser
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
ECT	endocardial cushion tissue
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EF	Ejektionsfraktion

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

EGF	epidermal growth factor
et al.	et alii
FBLN2	Fibulin-2
g	Gramm
x g	Erdbeschleunigung
GRIP2	„glutamate receptor interacting protein 2“
GTP	Guanosintriphosphat
HCl	Salzsäure
HDAC	„histone deacetylase“
HSPC	Hematopoietic stem/progenitor cells
IPTG	Isopropyl- β -thiogalactopyranosid
Kan	Kanamycin
kb	Kilobasen
kD	Kilo-Dalton
l	Liter
LB	Luria Bertani
LSM3	„Sm-like-3“
M	Molarität
m-	milli
MCS	„multiple cloning site“
MDKC	Madin-Darbin-Hunde-Nierenzellen
MEF2	„myocyte enhancer factor-2“
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min.	Minuten
mRNA	messenger RNA
μ	micro
n	nano
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natronlauge
NPC	nukleärer Kernporenkomplex
NUP210	„nucleoporin 210 kDa“
OD	optische Dichte
OMIM	„Online Mendelian Inheritance in Man“
p	pico
PCR	„polymerase chain reaction“
PDZ	„postsynaptic density-95/Discs large/zona occludens-1“
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	„revolutions per minute“, Umdrehungen pro Minute

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunden
SLC6A6	„solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, taurine), member 6“
SNP	„single nucleotide polymorphisms“, Einzelnukleotidpolymorphismen
SSC	„standard saline citrate“
STE	NaCl-Tris-EDTA
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TAUT	Taurintransporter
TBE	Tris-Borat-EDTA
TE	Tris-EDTA
TEMED	N',N',N,N-Tetramethylethylendiamin
TMEM43	„transmembrane protein 43“
TPRXL	„tetra-peptide repeat homeobox-like“
Tris	Tris-hydroxymethyl-aminomethan
TTP	Thymidintriphosphat
U	„unit“ (Einheit der Enzymaktivität)
UTR	„untranslated region“
UV	Ultraviolett
V	Volt
Vol	Volumen
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
WNT7A	„wingless-type MMTV integration site family, member 7A“
X-Gal	5-Brom-4-Chloro-3-Indolyl- β -Galactosid
XPC	Xeroderma pigmentosum, complementation group C

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Ludwig Thierfelder für seine intensive und gewissenhafte Betreuung und die Möglichkeit, diese Arbeit in seiner Arbeitsgruppe anfertigen zu dürfen. Seine Unterstützung und Förderung haben zur Motivation, wissenschaftlich zu arbeiten, und zum Abschluss der Arbeit beigetragen.

Weiterhin möchte ich mich ganz herzlich bei meinem Betreuer Dr. med. Jörg Drenckhahn für die Einarbeitung in den Themenbereich, die angenehme Zusammenarbeit und die unzähligen hilfreichen Diskussionen mit geduldiger Beantwortung aller Fragen bedanken.

Schließlich danke ich allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der AG Thierfelder für die freundliche Unterstützung bei der Arbeit und das gute Arbeitsklima.

Erklärung

„Ich, Kalina Brandt, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Mutationsanalyse an 14 Kandidatengenen für autosomal-dominant vererbte arrhythmogene rechtsventrikuläre Kardiomyopathie (ARVD5)“ 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