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

### DISSERTATION

Genetische Analyse des M-Banden-Proteins Myomesin 2 bei Patienten mit linksventrikulärer Non-Compaction-Kardiomyopathie

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Setareh Saleh- Edeş aus Sari, Iran

Datum der Promotion: 12.09.2014....

| Inha | <u>Inhaltsverzeichnis</u>                        |    |  |  |
|------|--------------------------------------------------|----|--|--|
| Abk  | kürzungsverzeichnis                              | IV |  |  |
| Zus  | ammenfassung – Abstrakt                          | VI |  |  |
|      |                                                  |    |  |  |
| 1.   | Einleitung                                       | 1  |  |  |
| 1.1  | Anatomie des Herzens                             | 1  |  |  |
| 1.2  | Das Sarkomer                                     | 2  |  |  |
| 1.3  | Die M-Bande                                      | 3  |  |  |
| 1.4  | Myomesin-Gen-Familie                             | 5  |  |  |
|      | 1.4.1 Struktur und Interaktion                   | 6  |  |  |
|      | 1.4.2 Funktion innerhalb des Sarkomers           | 7  |  |  |
| 1.5  | Kardiomyopathien                                 | 8  |  |  |
| 1.6  | Linksventrikuläre Non-Compaction-Kardiomyopathie | 10 |  |  |
|      | 1.6.1 Definition und Historie                    | 10 |  |  |
|      | 1.6.2 Epidemiologie                              | 11 |  |  |
|      | 1.6.3 Kardiale Embryologie und Pathogenese       | 12 |  |  |
|      | 1.6.4 Genetik                                    | 13 |  |  |
|      | 1.6.5 Klinische Symptome                         | 14 |  |  |
|      | 1.6.6 Diagnose und Therapie                      | 15 |  |  |
| 2.   | Zielsetzung der Arbeit                           | 16 |  |  |
| 3.   | Material und Methoden                            | 17 |  |  |
| 3.1  | Materialien                                      |    |  |  |
|      | 3.1.1 Chemikalien                                | 17 |  |  |
|      | 3.1.2 Enzyme und Nukleotide                      | 17 |  |  |
|      | 3.1.3 Molekulargewichtsmarker                    | 17 |  |  |
|      | 3.1.4 Kits                                       | 18 |  |  |
|      | 3.1.5 Verbrauchsmaterialien                      | 18 |  |  |

|           | 3.1.6 Geräte                                                | 18 |
|-----------|-------------------------------------------------------------|----|
|           | 3.1.7 Software                                              | 19 |
|           | 3.1.8 Patientenkollektiv                                    | 19 |
| 3.2       | Methoden                                                    |    |
|           | 3.2.1 DNA-Extraktion                                        | 20 |
|           | 3.2.2 Polymerasekettenreaktion                              | 20 |
|           | 3.2.3 Elektrophorese mittels Agarosegel                     | 23 |
|           | 3.2.4 Enzymatische Aufreinigung                             | 25 |
|           | 3.2.5 Sequenzierung                                         | 25 |
|           | 3.2.6 Sephadexplatten                                       | 27 |
|           | 3.2.7 Auswertung der Sequenzierung                          | 28 |
|           | 3.2.8 Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus-Analyse   |    |
|           | (RFLP Analyse)                                              | 28 |
| <u>4.</u> | Ergebnisse                                                  | 30 |
| 4.1       | PCR-Ergebnisse und Optimierungen                            | 30 |
| 4.2       | Sequenzierungsergebnisse                                    | 31 |
| 4.3       | Gefundene Variationen in Myomesin 2                         | 31 |
|           | 4.3.1 Bekannte Variationen                                  | 31 |
|           | 4.3.1.1 Synonyme Sequenzveränderungen                       | 31 |
|           | 4.3.1.2 Nicht-synonyme Sequenzveränderungen                 | 32 |
|           | 4.3.2 Unbekannte Variationen                                | 33 |
|           | 4.3.2.1 Synonyme Sequenzveränderungen                       | 33 |
|           | 4.3.2.2 Nicht-synonyme Sequenzveränderungen                 | 33 |
|           | Exon 14                                                     | 34 |
|           | Exon 20                                                     | 36 |
|           | Exon 25                                                     | 37 |
|           | Exon 26                                                     | 38 |
| 4.4       | Ergebnisse der Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus- |    |
|           | Analyse                                                     | 40 |

| 4.5         | Ergebnisse des Kontrollkollektives                     | 41   |
|-------------|--------------------------------------------------------|------|
| 4.6         | Zusammenfassung der Ergebnisse                         | 42   |
| <u>5.</u>   | Diskussion                                             | 43   |
| 5.1         | Überblick                                              | 43   |
| 5.2         | Methoden-Diskussion.                                   | 45   |
| 5.3         | Diskussion der erzielten Ergebnisse                    | 46   |
|             | 5.3.1 bekannte synonyme und nicht-synonyme Variationen | 46   |
|             | 5.3.2 unbekannte synonyme Variationen                  | 46   |
|             | 5.3.3 unbekannter nicht-synonyme Variationen           | 47   |
| 5.4         | Ausblick                                               | 50   |
| <u>Lite</u> | raturverzeichnis                                       | VIII |
| <u>Abb</u>  | ildungs- und Tabellenverzeichnis                       | XII  |
| <u>Anh</u>  | ang                                                    | XV   |
| <u>Eide</u> | esstattliche Versicherung                              | XIX  |
| <u>Leb</u>  | enslauf                                                | XX   |
| <u>Dan</u>  | ksagung                                                | XXI  |

# Abkürzungsverzeichnis

A Adenin

AHA American Heart Association

Ala Alanin
Ao Aorta
Arg Arginin
Asn Asparagin
AS Aminosäure
Asp Asparaginsäure
ATP Adenosintriphosphat

**B**etaine (N,N,N-Trimethylglycin)

bp Basenpaar

C Cytosin

cDNA copy DNA (komplementäre Desoxyribonukleinsäure)

Cys Cystein

dATP 2'-Desoxyadenosin-5'-triphosphatDCM Dilatative KardiomyopathiedCTP 2'-Desoxycytosin-5'-triphosphate

ddNTPs Didesoxynucleotide

dGTP 2'-Desoxyguanosin-5'-triphosphate

dH2O deionisiertes Wasser
DMSO Dimethylsulfoxid
DNA Desoxyribonukleinsäure

dNTP(s) Desoxyribonukleosid-Triphosphat(e) dTTP 2'-Desoxythymidin-5'-triphosphat

EDTA Ethylendiamintetraacetat EKG Elektrokardiogramm

ESC Europäische Gesellschaft für Kardiologie

et al. et alli (und andere)

**F** Forward (vorwärts)

fDCM familiäre dilatative Kardiomyopathie

FNIII Fibronektin-Typ-III

G Guanin
Gln Glutamin
Glu Glutaminsäure

Gly Glycin

HCM hypertrophe Kardiomyopathie HiDi-Formamid reines Formamid (highly deionized)

His Histidin

HPLC high perfomance liquid chromatography (Hochdruck-Flüssigkeits-

Chromatographie)

iDCM idiopathische dilatative Kardiomyopathie

Ig Immunoglobulin

Ile Isoleucin

kb Kilobase

KHK Koronare Herzkrankheit

leu Leucin

LH Linke Hauptkammer (Ventrikel)

LV Linksventrikulär

LVNC Linksventrikuläre Non-Compaction

Lys Lysin

M Molekulargewichtsmarker Typ VIII

Met Methionin

MgCl Magnesiumchlorid

mM millimolar

MRT Magnetresonanztomographie

mV millivolt

NaCl Natriumchlorid NaOH Natriumhydroxid

NCCM Non-Compaction-Kardiomyopathie

NH<sub>4</sub> Ammonium-Ion

Pa Pulmonalarterie

PCR Polymerase-chain-reaction (Polymerase-Kettenreaktion)

Pro Prolin

**R** Reverse (Rückwärts)

RCM restriktive Kardiomyopathie

RFLP Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus

RH rechte Hauptkammer (Ventrikel)

RV rechter Vorhof

Ser Serin

SNP(s) single nucleotide polymorphism (Single-Nukleotid-Polymorphismus)

SNP ID SNP Identifikationsnummer

syn. synonym

T Thymin

T<sub>AN</sub> Annealingtemperatur
Taq Thermus Aquaticus

TBE Tris-HCL-Borat-Ethylendiamintetraacetat

Thr Threonin

Tris 2-Amin-2-(hydroxylmethyl)-Propan-1,3-diol

U Units (Enzymeinheit) UV-Licht Ultraviolettes Licht

Val Valin

WHO World Health Organisation (Weltgesundheitsorganisation)

# Zusammenfassung - Abstrakt

Die linksventrikuläre Non-Compaction-Kardiomyopathie (LVNC) ist eine im Vergleich zu hypertrophen (HCM) und dilatativen (DCM) Kardiomyopathien bisher nur wenig untersuchte Herzmuskelerkrankung. Sie gewinnt jedoch als primäre genetische Erkrankung stetig an Bedeutung hinzu. LVNC ist auf eine Arretierung des Verdichtungsprozesses des Myokards während der myokardialen Morphogenese zurückzuführen. Bisher konnte gezeigt werden, dass bei einer LVNC Sarkomer-Proteine häufig von Mutationen betroffen sind.

Myomesin 2 ist verantwortlich für die korrekte Quervernetzung zwischen Titin und Myosin und somit unverzichtbar für Funktionen des Sarkomers. Für Myomesin 1 wurde bereits ein direkter Zusammenhang zwischen definierten Mutationen und Kardiomyopathien nachgewiesen. Angesichts der strukturellen und funktionellen Homologie zwischen den Proteinen der Myomesin-Genfamilie liegt es nahe, deren anderen Vertreter, Myomesin 2 bzw. Myomesin 3, auf pathologisch relevante Mutationen hin zu untersuchen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde MYOM-2 als ein interessantes Kandidatengen für LVNC analysiert. Zu diesem Zweck wurde die genomische DNA von 52 LVNC Patienten molekulargenetisch untersucht. Dabei wurde jedes der 37 Exons des MYOM-2-Gens per PCR und anschließender Sequenzierung auf Variationen überprüft.

Als Ergebnis der Exon-Sequenzierungen des MYOM-2-Gens wurden sechs unbekannte nichtsynonyme Variationen in den Exons 14, 20, 25 und 26 gefunden, sowie zwei unbekannte synonyme Variationen in den Exons 2 und 19. Die unbekannten nicht-synonymen Variationen befinden sich in den funktionell wichtigen Immunoglobulin-ähnlichen- und Fibronektin-Typ-III-Domänen. Diese Domänen sind wichtig für Protein-Protein-Interaktionen zwischen Myomesin 2 und weiteren M-Banden-Proteinen. Die gewonnenen Daten wurden mit einem aus 400 Kontrollen bestehenden Kollektiv verglichen; keine der sechs Variationen wurde hierbei gefunden. Darüber hinaus wurden zahlreiche bekannte synonyme und nicht-synonyme SNPs bestätigt.

Um zu klären, ob die gefundenen Variationen wirklich krankheitsrelevant sind, könnten sowohl weitere familiäre LVNC-Patienten analysiert werden als auch Analysen der biophysikalischen und biochemischen Eigenschaften der hier beschriebenen veränderten Domänen durchgeführt werden.

# Abstract

Left ventricular Non-Compaction-Cardiomyopathy (LVNC) is a so far underinvestigated myocardial disease, compared to hypertrophic or dilatative cardiomyopathies. Nevertheless, LVNC as primary genetic disorder recently started gaining in importance. It is attributed to an arrest of the myocardial compaction process during morphogenesis of the myocardium. To date, it has been shown that LVNC is connected with sarcomeric proteins often carrying mutations.

Myomesin 2 is responsible for the proper crosslink between titin and myosin and therefore indispensable for accurate sarcomer function. There is already evidence between defined mutations and cardiomyopathy in the context of myomesin 1. Therefore and given the structural and functional homology within the member-proteins of the myomesin gene-family it stands to reason to also analyze other family representatives, (e.g. myomesin 2 or 3) in regard to pathologically relevant mutations.

MYOM-2, as an interesting candidate gene for LVNC, was analyzed in the scope of this study. For this purpose genomic DNA of 52 LVNC patients was assessed using molecular-genetic methods. Each of the 37 exons of MYOM-2 were amplified by PCR and subsequently sequenced for variations.

This procedure resulted in identifying six unknown non-synonymous variations within exons 14, 20, 25 and 26, as well as two unknown synonymous variations within exons 2 and 19. The unknown non-synonymous variations are located in immunglobulin-like and fibronectin-type-III-like domains. These domains are vital for protein-protein-interactions between myomesin 2 and other M-band-components. The collected data were compared with a set of genomic DNA from 400 healthy individuals, in which none of the six variations was found. Beyond that, numerous known synonymous and non-synonymous SNPs were confirmed.

In order to clarify the relevance of the found variations future studies could focus on further LVNC patients with hereditary dispositions as well as analyze the biophysical and biochemical characteristics of the altered domains described in this study.

# 1. Einleitung

### 1.1 Anatomie des Herzens

Das Herz ist ein muskuläres Hohlorgan, das durch rhythmische Kontraktionen den Blutkreislauf des Organismus aufrecht erhält. Gewöhnlich ist es etwas größer als die eigene Faust und befindet sich asymmetrisch zwischen dem rechten und linken Lungenflügel im Brustkorb (Samandari & Mai, 1995). Es besteht aus vier Hohlräumen, die paarig nebeneinander liegen. Die Scheidewand (Septum interventriculare) teilt das Herz in eine rechte muskelschwache und eine linke muskelstarke Herzhälfte. Jede Hälfte besteht aus einem Vorhof (Atrium) und einer Kammer (Ventriculus), die jeweils mit Hilfe von Klappen (Trikuspidalklappe und Mitralklappe) miteinander in Verbindung stehen (Abb.1).

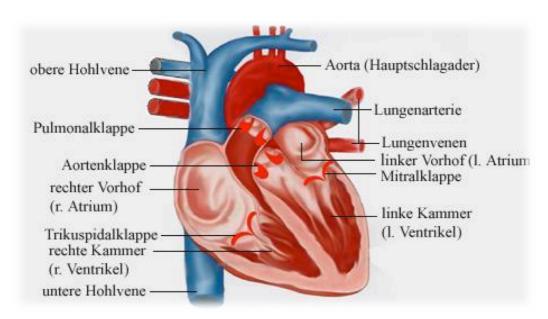


Abbildung 1: Schematischer Aufbau des Herzens und des daran angeschlossenen Gefäßsystems

Die Wand der Vorhöfe und der Kammern besteht aus drei Schichten, die von außen nach innen als Epikard, Myokard und Endokard bezeichnet werden. Das Myokard ist die muskulöse Mittelschicht des Herzens. Im Gegensatz zu der Myokardschicht der Vorhöfe ist die der Kammern entsprechend ihrer höheren Leistung dicker. An der rechten Kammer beträgt sie etwa 0,5 cm und an der linken Kammer ca. 1 cm.

An der Kammer werden äußere, mittlere und innere Muskelschicht unterschieden. Die Fasern der äußeren und der inneren Schicht verlaufen in Schraubentouren senkrecht zueinander, die der mittleren Schicht sind quer gerichtet (Samandari & Mai, 1995). An der

Innenseite der Kammern befinden sich grobmaschige Muskelbalken (Trabeculae) und Papillarmuskeln, die vom Endokard überzogen werden.

Die Muskelzellen des Myokards besitzen die Fähigkeit zu synchronisierten kontraktilen Bewegungen, die in ihrer Gesamtheit den Herzschlag ausmachen. Es gibt zwei Typen von Herzmuskelzellen. Die einen leisten die kontraktile Arbeit während die anderen für die Bildung und Weiterleitung von elektrischen Potenzialen notwendig sind.

### 1.2 Das Sarkomer

Das Sarkomer ist die kleinste funktionelle und kontraktile Einheit der Herzmuskelzellen. Die Kontraktion selber wird durch ein Übereinandergleiten der Myosin- und Aktin-Filamente erzeugt. Der Herzmuskel zählt zur quergestreiften Muskulatur. Die Querstreifung basiert auf der regelmäßigen Anordnung der dünnen Aktin- und dicken Myosinfilamente. Die Aktinfilamente setzen sich aus Aktin, Troponin, Tropomyosin und Nebulin bzw. Nebulette im Herzmuskel zusammen. Myosinfilamente bestehen hauptsächlich aus Myosin.

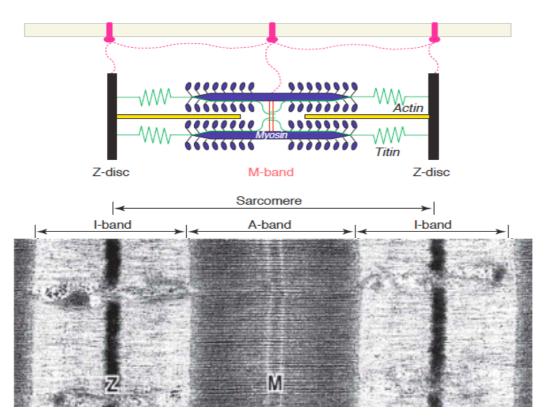


Abbildung 2: Schematische Darstellung des Sarkomers

Oben: Aktinfilamente: dunkelgelb; Myosinfilamente: blau; Titinfilamente: grün; Transversale Strukturen sind die Z-Linie (schwarz) und M-Bande (rot). Die extrasarkomeren Proteine (rosa) sind im Sarkolemm durch Transmembran-Proteine verankert. Unten: Elektronenmikroskopische Aufnahme der skelettalen Sarkomer-Struktur (Agarkova *et al.*, 2005; Sjöström *et al.*, 1977).

Unter dem Elektronenmikroskop erkennt man bei einer längs präparierten Muskelfaser helle und dunkle Streifen. Die Aktinfilamente befinden sich in der hellen I-Bande (I = isotrop) und die Myosinfilamente in der dunklen A-Bande (A = anisotrop). Die freien Enden der Aktinfilamente reichen in die A-Bande und es kommt zur Überlappung von Aktin- und Myosinfilamenten. Die I-Bande wird von der Z-Linie halbiert, die Strecke zwischen zwei Z-Linien wird als Sarkomer bezeichnet. Somit umfasst ein Sarkomer zwei Hälften der I-Bande und eine ganze A-Bande. Die Enden der Aktinfilamente zweier benachbarter Sarkomere sind im Bereich der Z-Linie durch das Protein  $\alpha$ -Actinin miteinander verzahnt. Im Zentrum der A-Bande erkennt man zwei hellere Linien und dazwischen liegende M-Banden, die nur aus dicken Myosinfilamenten bestehen. Die Myosinfilamente sind in der M-Linie durch verschiedene Proteine miteinander vernetzt (Abb.2).

### 1.3 Die M-Bande

Die M-Bande gehört zu den transversalen Strukturen des Sarkomers und ist verantwortlich für die korrekte Ausrichtung der dicken Filamente (Abb.2) (Luther *et al.*, 1981). Die M-Banden-Filamente spielen eine wichtige Rolle bei der Anordnung der dicken Myosinfilamente während der Kontraktion des Sarkomers. Zusätzlich verhindern sie eine Deformation während der Entspannung des Sarkomers. Das ist der Grund für den optimalen und konstanten Abstand zwischen den dicken und dünnen Filamenten zu Beginn der Kontraktion (Millman 1998; Agarkova *et al.*, 2003). Im Verlauf der Myofibrillogenese ordnen sich die dicken Filamente und die Titin-Filamente zu einer hexagonalen Gitterstruktur. Dabei spielt die M-Bande ebenfalls eine bedeutende Rolle (Wang *et al.*, 1998; Ehler *et al.*, 1999).

Über die Molekularstruktur der M-Bande ist noch wenig bekannt. Wichtige Bestandteile der M-Bande sind die Proteine Titin, Myomesin 1 (früher: Myomesin) und Myomesin 2 (früher: M-protein). Nach heutigem Wissensstand sind lediglich die C-terminalen Abschnitte des Titins (Labeit *et al.*, 1995), Myomesins 1 (Eppenberger *et al.*, 1981; Grove *et al.*, 1984) und Myomesins 2 (Masaki und Takaiti 1974) bekannt. Myomesin 1 und Titin haben ähnliche Strukturen und Eigenschaften. Beide bestehen aus Immunoglobulin- (Ig) und Fibronektin-Typ-III (FNIII) Domänen. Die Prolin-Glutamat-Valin-Lysin (PEVK)-Domäne des Titins ähnelt der EH-Domäne von Myomesin 1. Für die Elastizität des Sarkomers sind sowohl Titin als auch Myomesin 1 verantwortlich (Schoenauer *et al.*, 2005). Myomesin 1 und Myomesin 2 besitzen ebenfalls ähnliche Strukturen. Beide bestehen aus einer

aminoterminalen Anfangsdomäne, gefolgt von Fibronektin (FN) -Domänen an die eine Immunoglobulin (Ig)-Domäne anschließt (Abb.3).

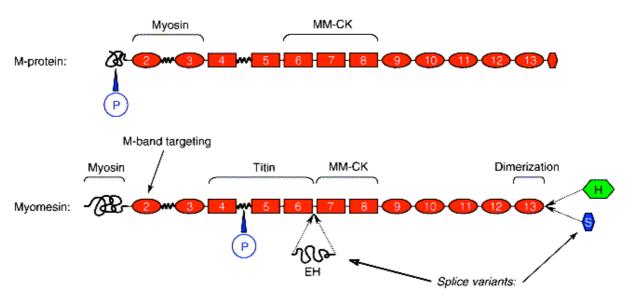


Abbildung 3: Schematische Darstellung der M-Banden-Komponenten: Myomesin 2 und Myomesin 1

Beide Proteine bestehen aus Ig- (Ellipse) und FN-Domänen (Rechteck). Myomesin hat zwei alternative Splice-Stellen, von der sich eine am C-terminalen Ende befindet. Die EH-Myomesin-Isoform wird durch das Einschließen des EH-Fragments in der Mitte des Moleküls gebildet. MM-CK: Bindestelle für MM-Kreatin-Kinase, Titin: Bindestelle für das Titin-protein (Agarkova *et al.*, 2005).

Wenn man das vereinfachte Diagramm der molekularen Komposition der M-Bande in verschiedenen Muskeltypen betrachtet, stellt man fest, dass die absolute Menge an Myomesin 1 konstant ist. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die Menge an Myomesin 1 proportional zur Menge von ß-myosin heavy chain (ß-MHC) im Sarkomer ist (Agarkova *et al.*, 2003). Die Menge von EH-Myomesin (Myomesin 3) zur Menge des Myomesin 2 ist jedoch umgekehrt proportional (Abb.4). Daraus lässt sich wiederum ableiten, dass Myomesin ein essentieller Bestandteil aller M-Banden ist.

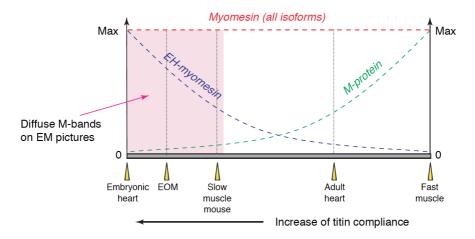


Abbildung 4: Molekulare Komposition der M-Bande in verschiedenen Muskeltypen

Die vertikale Achse zeigt die relative Expression der verschiedenen Komponenten der M-Bande, während auf der horizontalen Achse die verschiedenen Muskeltypen aufgezeichnet wurden. Myomesin (rote Linie) zeigt sich konstant in allen Muskeltypen während Myomesin 2 (grüne Linie) und EH-Myomesin (blaue Linie) eine unterschiedliche Expression zeigen (Agarkova *et al.*, 2005).

Weitere Proteine der M-Bande, die bis dato identifiziert wurden, sind Myosin, Titin, Obscurin, Obscurin-like-1 und Muskeltyp-Keratin-Kinase (Lange *et al.*, 2006). Nach heutigem Wissensstand sind Myomesin 1 und Myomesin 2 hauptverantwortlich für die Funktion der M-Bande. Die Proteine der Myomesin-Familie sind wichtig bei der Vernetzung des dicken Filaments der M-Bande (Agarkova *et al.*, 2005).

# 1.4 Myomesin-Gen-Familie

Zur Myomesin-Gen-Familie gehören das Myomesin 1, das Myomesin 2 und das Myomesin 3 (Schoenauer *et al.*, 2008). Sie werden jeweils von den Genen MYOM-1, MYOM-2 und MYOM-3 kodiert (Fukuzawa *et al.*, 2008). Strukturell und funktionell sind sich alle drei Proteine ähnlich. Sie unterscheiden sich jedoch in ihren biophysikalischen Eigenschaften und ihrem Muskelzell-spezifischen sowie ontogenetischen Expressionsmuster. Die EH-Myomesin 1-Isoform, die durch den Einschluss eines elastischen Segments im Zentrum des Moleküls gebildet wird, ist die Hauptkomponente im embryonalen Herzen höherer Vertebraten (Abb.5) (Agarkova *et al.*, 2000). Das Myomesin 2 wird im adulten Herzgewebe und schnellen Skelettmuskeln exprimiert (Grove *et al.*, 1985). Myomesin 3 hingegen ist in mittelschnellen Fasern der Skelettmuskulatur zu finden (Schoenauer *et al.*, 2008).

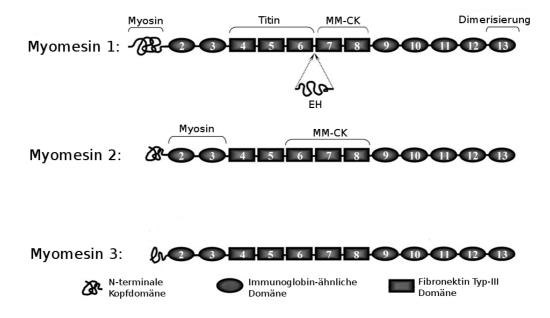


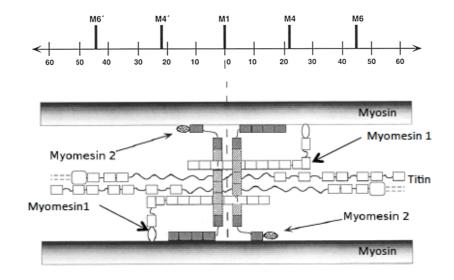
Abbildung 5: Proteinstruktur der Myomesin-Protein-Familie

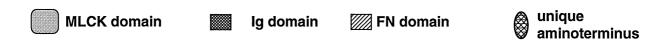
Sie bestehen aus einer amino-terminalen Kopfdomäne, sieben Ig-ähnliche und fünf FN-Typ-III (FNIII) -Domänen. (Schoenauer *et al.*, 2008).

Durch die differentielle Expression der drei Myomesin-Proteine wird der M-Bande die Fähigkeit verliehen, Veränderungen der kontraktilen Parameter dynamisch zu begegnen und sich anzupassen. Dies ist nicht nur während der individuellen Entwicklung eines Organismus wichtig, sondern scheint auch eine Anpassungsreaktion an krankhafte Umstände innerhalb der Herzmuskulatur zu sein. So wurde entdeckt, dass die M-Bande ihre Proteinzusammensetzung in einem versagenden Herzen ändern kann (Schoenauer *et al.*, 2011). Dieser Prozess scheint Teil einer allgemeineren Anpassung des sarkomeren Zytoskeletts an "ungünstige Arbeitsbedingungen" in einem krankhaften Herzen zu sein.

#### 1.4.1 Struktur und Interaktionen

Die strukturelle Ähnlichkeit der evolutiv verwandten Myomesinmoleküle leitet sich von der funktionell identischen Aufgabe ab, welches die transversale Verknüpfung des Titins mit dem Myosin beinhaltet (Abb.7). Die Myomesin-Proteine bestehen alle aus einer Nterminalen Kopfdomäne, gefolgt von zwei Ig-ähnlichen Domänen, fünf FNIII-Domänen an die erneut fünf Ig-ähnliche Domänen anschließen (Abb.6) (Agarkova *et al.*, 2004; Schoenauer *et al.*, 2008).





**Abbildung 6: Anordnung von Myosin, Myomesin 1, Myomesin 2 und Titin in der M-Bande** Auf der horizontalen Achse oben sind fünf M-Brücken M6', M4', M1, M4 und M6 eingezeichnet. Das untere Schema deutet die Strukturen von Myomesin 1 und Titin an. Myomesin 2 bildet durch eine antiparallele Anordnung die M1-Brücke in der M-Bande (Obermann *et al.*, 1997).

Myomesin kann sowohl mit heterologen Proteinen als auch mit anderen Myomesin-Proteinen interagieren. N-terminal geht es eine Interaktion mit Myosin ein. Im zentralen Teil befinden sich Bereiche, in der Interaktionen mit Titin und der Muskeltyp-Kreatin-Kinase ermöglicht werden, während die C-terminale Domäne 13 antiparallele Homodimere bilden kann (Schoenauer *et al.*, 2005).

#### 1.4.2 Funktion innerhalb des Sarkomers

Antiparallele Myomesin-Dimere scheinen Myosin-Filamente quer zu vernetzen, ähnlich wie das alpha-Aktinin die Aktin-Filamente in der Z-Scheibe vernetzt (Schoenauer *et al.*, 2005). Deutlich wird das durch das drei-dimensionale Model der M-Bande (Lange *et al.*, 2005) (Abb.7). Genanntes 3D-Modell sowie Arbeiten von Schoenauer und Agarkova implizieren, dass Myomesin eine Art "Feder-Funktion" innerhalb des Sarkomers einnimmt. Nach dieser Erklärung befindet sich das Myomesin im relaxierten Muskel in einem kompakten Zustand, um während der Aktivierung des Sarkomers gestreckt zu werden. In einer seriellen Abfolge werden dann die verschiedenen FNIII- und Ig-Domänen gestreckt. Letztendlich fungiert Myomesin wie eine Rückstellfeder, die eine Kraft entgegengesetzt zur Zugkraft aufbaut, um den ursprünglichen kompakten Zustand wieder herzustellen.

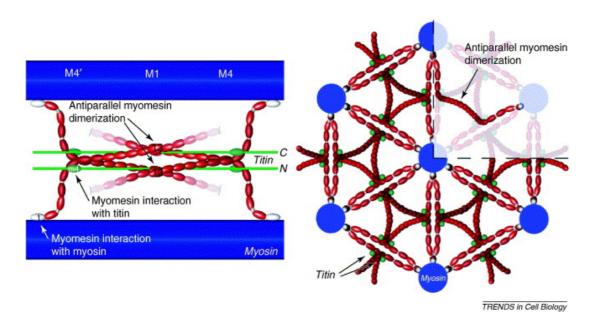


Abbildung 7: Drei-dimensionales Modell des Myomesins in der M-Bande

Longitudinale Sicht: zwei Myomesin-Filamente bilden ein antiparalleles Dimer miteinander. Die Bindungsstellen für die Dimerisation befinden sich in der C-terminalen Domäne 13 (MYOM 13). Bindungsstellen von Myomesin mit Myosin (weiß,1) und Myomesin mit Titin (grün,m4). Transversale Sicht: Projektion der Molekular-Interaktionen zwischen Myomesin, Titin und Myosin. Die Stellung der Myomesin-Dimere ist im oberen rechten Quadranten hervorgehoben (Lange *et al.*, 2005).

Das Gen MYOM-2 liegt auf dem Chromosom 8p23.3. Es besteht aus 37 Exons und 36 Introns mit einer Gesamtlänge von 5014 Basenpaaren (bp). Das größte Exon ist 200bp lang (Exon 12) und das kleinste 23bp (Exon 35). Nicht-kodierende Bereiche umfassen Exon 1, Teile von Exon 2 und Exon 37 (Abb.8). Die MYOM-DNA-Sequenz kann unter der Nummer ENSG00000036448 in der Ensemble-Datenbank gefunden werden. Die Ig-Domäne des MYOM 2 ist verantwortlich für den korrekten Einbau des Myomesins in die M-Bande (Auerbach *et al.*, 1999).

# 1.5 Kardiomyopathien

Der Begriff "Kardiomyopathie" wurde erstmals im Jahr 1957 von Bridgen als primäre Herzmuskelerkrankung mit unbekannter Ursache beschrieben, die nicht durch koronare Herzerkrankungen, Hypertonien oder angeborene Herzfehler bedingt ist (Aman *et al.*, 1997). Die erste WHO-Klassifikation wurde im Jahr 1980 in Paris erarbeitet. Diese Klassifikation definiert Kardiomyopathie als eine Herzerkrankung mit unklarer Ursache. Im Jahr 1995 wurde eine neue Definition und Klassifikation von der WHO vorgestellt, in der Kardiomyopathien als Erkrankungen des Myokard bezeichnet wurden, die mit kardialen Funktionsstörungen assoziiert sind (Richardson *et al.*, 1996). Mit zunehmendem Verständnis

der Ätiologie und der Pathogenese entstand ein immer komplexeres Bild der grundlegenden Ursachen einer Kardiomyopathie (Kreuder 2004).

Im März 2006 hat die American Heart Association (AHA) eine aktualisierte Definition und Klassifikation der Kardiomyopathien vorgeschlagen, die auf die Arbeiten von Maron et al. zurückgeht. Maron beschreibt Kardiomyopathien als eine heterogene Gruppe von Herzmuskels. mechanischen Krankheiten des die mit und/oder elektrischen einhergehen und üblicherweise (aber nicht zwingend) Funktionsstörungen unangemessene Hypertrophie oder Dilatation der Herzkammern verursachen. Ihre Ursachen sind vielfältig und häufig genetisch bedingt. Kardiomyopathien begrenzen sich entweder auf das Herz oder sind Teil einer allgemeinen Systemerkrankung, führen oft zu kardiovaskulär bedingten Todesfällen oder einer fortschreitenden Behinderung durch Herzversagen (Maron et al., 2006). Darüber hinaus unterscheidet Maron zwischen primären und sekundären Kardiomyopathien. Diese Klassifikation wurde von der AHA übernommen.

### Primäre Kardiomyopathien

Primäre Kardiomyopathien können angeboren, erworben oder durch beide Faktoren bedingt sein (Abb.8). Das gemeinsame Merkmal ist dabei der direkte Einfluss auf den Herzmuskel. Die linksventrikuläre Non-Compaction-Kardiomyopathie (LVNC) gehört zu der Klasse, der durch genetische Veränderungen verursachten, Krankheitsbilder. Im Folgenden wird detaillierter auf diese Unterklasse der primären Kardiomyopathien eingegangen.

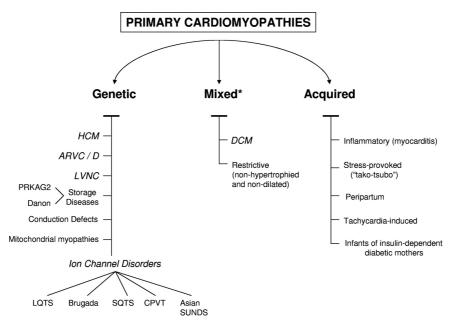


Abbildung 8: Schema der AHA-Klassifikation für primäre Kardiomyopathien Linksventrikuläre Non-Compaction Kardiomyopathie (LVNC) (nach AHA ,online).

### Sekundäre Kardiomyopathien

Sekundäre Kardiomyopathien entstehen durch systemische Krankheitsprozesse, die zunächst keine direkte Verbindung mit dem Herzmuskel aufweisen, aber in ihrem Verlauf die Herzmuskeltätigkeit negativ beeinflussen können. Eine in den westlichen Industriestaaten weit verbreitete Ursache ist beispielsweise ein andauernder Stresszustand, der sich letztendlich in pathogenen Manifestationen der Herzmuskeltätigkeit niederschlagen kann (Abb.9).

| Erkrankungen des Myokards<br>durch nicht-kardiale Ursachen |                               |                                 |                             |  |
|------------------------------------------------------------|-------------------------------|---------------------------------|-----------------------------|--|
| a) Kardial                                                 |                               | b) Systemisch                   |                             |  |
| Toxisch                                                    | Radiotherapie,                | <ul> <li>Metabolisch</li> </ul> | Endokrinopathien            |  |
|                                                            | Chemotherapie                 | <ul> <li>Nutritiv</li> </ul>    | Beriberi, Selen,            |  |
| • Inflammatorisch Viruspersistenz                          |                               |                                 | Carnitine                   |  |
| Autoimmun                                                  | Kardiospezifische<br>Moleküle | Rheumatisch                     | SLE, RA, DM,<br>Sarcoidosis |  |
| Ischämisch                                                 | KHK                           | Infektiös                       | Chagas                      |  |
| Stress Tachykardie,     Tako-Tsubo                         |                               | Eosinophil                      | Löffler, Churg-<br>Strauss  |  |
|                                                            |                               | Speicher-<br>erkrankung         | Amyloidose                  |  |

Abbildung 9: Tabellarische Ordnung sekundärer Kardiomyopathien (Kaya et al., 2008).

### 1.6 Linksventrikuläre Non-Compaction-Kardiomyopathie (LVNC)

#### 1.6.1 Definition und Historie

LVNC ist eine angeborene Erkrankung, die auf eine Störung der myokardialen Morphogenese zurückzuführen ist (Oechslin *et al.*, 2011) (Abb.10).

Chin et al. waren die ersten, die die Arretierung des Verdichtungsprozesses des Myokards während der Embryogenese als ursächlich erkannten und den Begriff "isolated noncompaction of left ventricular myocardium" definierten (Chin et al., 1990). Ursprünglich wurde bereits 1926 ein spongiöses Erscheinungsbild in einer Vielzahl von Patienten mit angeborenen Herzfehlern von Grant et al. beschrieben, die jedoch dem heutigen Wissen nach LVNC-atypisch waren (Grant et al., 1926; Oechslin et al., 2011). Erst 58 Jahre später wurde eine isolierte und seltene Form myokardialer Anomalien beschrieben (Engberding et al., 1984).

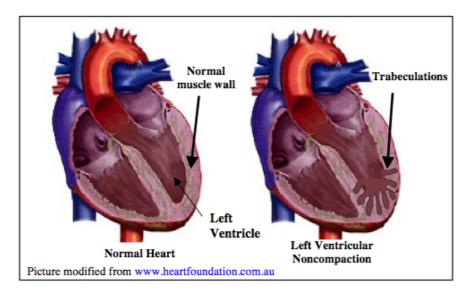


Abbildung 10: Schematische Darstellungen eines gesunden (links) und eines an LVNC erkrankten Herzens (rechts). Pathologische Veränderungen der Herzmuskelwand sind durch dicke Pfeile gekennzeichnet (AGHDR 2012)

Bis zur Entwicklung moderner Analysemethoden des vitalen Herzmuskels wie der Echokardiographie wurde die Prävalenz von LVNC unterschätzt (Ichida *et al.*, 2009). Heutzutage gewinnt sie als primäre genetische Kardiomyopathie immer mehr an Bedeutung.

### 1.6.2 Epidemiologie

Die tatsächliche Epidemiologie der LVNC ist äußerst schwierig zu beurteilen. Dies beruht hauptsächlich darauf, dass zum einen die Studien systemische Fehler aufweisen und zum anderen die voranschreitende Verbesserung der Diagnostik sowie das erhöhte Bewusstsein für diese Krankheitsform die Prävalenz über die Zeit hinweg stark beeinflusst haben (Oechslin *et al.*, 2011; Ichida *et al.*, 2009). Systemische Fehler in den Studien beruhen beispielsweise auf der Auswahl des untersuchten Patientenkollektivs sowie der oft retrospektiven Natur der meisten derartigen Studien (Oechslin *et al.*, 2011).

Nichtsdestotrotz sind die Patienten im Durchschnitt 7 Jahre alt, wenn bei ihnen eine LVNC diagnostiziert wird. Das tatsächliche Alter variiert dabei von 11 Monaten bis zu 22 Jahren (Weiford *et al.*, 2004). Ursprünglich wurde LVNC als seltene Krankheit mit einer Prävalenz im Erwachsenenalter von <0,3% und einer jährlichen Inzidenz von <0,1 per 100.000 bei Kindern angegeben (Ichida *et al.*, 2009; Nugent *et al.*, 2003). Nugent *et al.* berichten zudem in ihrer ebenfalls retrospektiven Studie primärer Kardiomyopathien unter australischen Kindern, dass 9,2% aller Fälle auf LVNC zurückzuführen sind. Dieses Ergebnis wird von der Echokardiographie-Datenbank des Texas-Kinderkrankenhauses bestätigt (9,5%) (Pignatelli *et al.*, 2003).

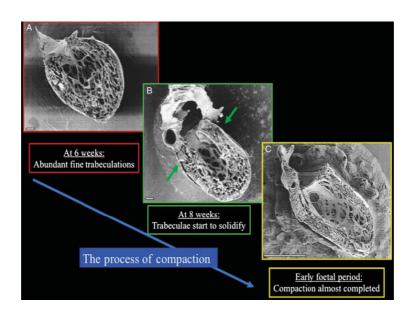
Damit ist LVNC bei Kindern nach der dilatativen und der hypertrophen Kardiomyopathie die dritthäufigste Kardiomyopathieform (Andrews *et al.*, 2008).

### 1.6.3 Kardiale Embryologie und Pathogenese

Das Myokard entwickelt sich aus zwei unterschiedlichen Schichten, einer kompakten Schicht und einer trabekulären Schicht. Das Endokard bildet die zelluläre Basis der trabekulären Schicht während sich die kompakte Schicht subepikardial ausbildet (Bernanke *et al.*, 2002).

In der 5. bis 8. Woche der embryonalen Entwicklung des menschlichen Myokards kommt es dann zu einer Verdichtung des Ventrikelmyokards mit Umwandlung der großen intertrabekulären Zwischenräume in Kapillaren, während sich die kleineren Zwischenräume zurückbilden. Dieser Verdichtungsprozess (compaction) verläuft einerseits vom Epikard zum Endokard und andererseits von der Herzbasis zur Herzspitze (Abb.11). Parallel dazu entwickeln sich die epikardialen Koronargefäße (Bernanke *et al.*, 2002; Freedom *et al.*, 2005).

Als pathogenetischer Mechanismus für die LVNC wird eine Arretierung des Verdichtungsprozesses - die Non-Compaction - in diesem komplexen embryonalen Prozess der endomyokardialen Morphogenese angenommen (Bernanke *et al.*, 2002, Weiford *et al.*, 2004).



**Abbildung 11: Natürlicher Verdichtungsprozess während der Embryonalentwicklung** Parietale Ansicht sagittaler Schnitte humaner embryonaler linker Ventrikel in verschiedenen Phasen des trabekulären Verdichtungsprozesses (Varnava *et al.*, 2001).

#### 1.6.4 Genetik

Wie bereits in Abschnitt 1.5 erwähnt gehört LVNC zu den primären genetisch bedingten Kardiomyopathien (Abb.9). Dies manifestiert sich während der Embryogenese in einer gestörten Myokardentwicklung (Abschnitt 1.6.3). Zudem kann LVNC sowohl isoliert als auch mit anderen Kardiomyopathien familiär (18-50%) oder auch spontan auftreten (Oechslin *et al.*, 2011; Chin *et al.*, 1990; Ritter *et al.*, 1997). Daher wurde schon früh nach genetischen Aberrationen, die im Zusammenhang mit LVNC stehen, gesucht. Es konnte gezeigt werden, dass LVNC eine genetisch heterogene Erkrankung mit Mutationen im mitochondrialen Genom, im Zytoskelett, der Z-Linie und in sarkomeren Proteinen ist (Sen-Chowdhry *et al.*, 2008) (Abb.12).

bis 44 % familiäre Häufung bei genetisch heterogenen Befunden

betroffene Chromosomen:
autosomal dominant und
X-chromosomal gebundene Erbgänge

verschiedene Mutationen im G 4.5 Gen für Tafazzin (auf Xq28)

alpha-Dystrobrevin (DTNA)
LIM-domain binding-Proteine:
LDB3, Cypher/ZASP, Lamin A/C

Sarkomerproteine

- β-Myosin (MYH7)

- alpha-cardiac Actin (ACTC)

- kardiales Troponin T (TNNT2)

Abbildung 12: Genetische Mutationen bei LVNC (Deutsches Ärzteblatt)

Die Heterogenität der gefundenen Mutationen im Kontext von LVNC bezieht sich sowohl auf das Alter der Patienten (Kinder vs. Erwachsene), als auch auf die Form (familiär vs. isoliert). Gute Beispiele dafür sind Mutationen in den Genen G4.5 und alpha-Dystrobrevin (DTNA). Während G4.5-Mutationen in adulten Populationen nicht gefunden werden konnten, dominieren sie innerhalb von infantilen Populationen, in der die Krankheit hauptsächlich x-chromosomal vererbt wird (Oechslin *et al.*, 2011). Mutationen im DTNA-Gen sind gehäuft in familiären Fällen beschrieben worden, allerdings sind sie in isolierten LVNC-Fällen extrem selten anzutreffen (Ichida *et al.*, 2001; Kenton *et al.*, 2004).

In der Gruppe der Mutationen innerhalb von Sarkomerproteinen ist augenfällig, dass mehrere der in LVNC-Patienten gefundenen Mutationen auch gehäuft bei anderen Krankheitsbildern wie z.B. hypertropher (HCM) oder dilatativer Kardiomyopathie (DCM) auftreten (Klaassen *et al.*, 2008; Monserrat *et al.*, 2007; Hoedemaekers *et al.*, 2007).

Insgesamt scheint es eine gemeinsame Ätiologie verschiedener kardiomyopathischer Phänotypen zu geben. Darüber hinaus gibt es weitere chromosomale Loci (Chr1, Chr5, Chr11), die in Verbindung mit LVNC gebracht werden (Zaragoza *et al.*, 2007; Sasse-Klaassen *et al.*, 2004). In diesen Fällen konnten die spezifischen Gene jedoch noch nicht identifiziert werden.

### 1.6.5 Klinische Symptome

Das Hauptsymptom der LVNC ist eine Herzinsuffizienz. Die, durch die gestörte Embryonalentwicklung bedingte, unregelmäßige Muskelstruktur führt zu regionalen Unterversorgungen und zur Fibrosierung des Herzens. Daraus entwickeln sich im Anschluss die Insuffizienz und die elektrischen Leitungsstörungen. Häufig werden auch thromboembolische Ereignisse und intraventrikuläre Thromben angetroffen (Engberding *et al.*, 1984). Patienten mit LVNC fallen mit klassischen Komplikationen, wie ventrikulären Arrhythmien und Herzstillstand auf (Oechslin *et al.*, 2011) (Abb.13).

| Erwachsene Patienten             |                      |                      |                    |                      |                         |
|----------------------------------|----------------------|----------------------|--------------------|----------------------|-------------------------|
|                                  | Oechslin et al. (15) | Sengupta et al. (16) | Murphy et al. (17) | Lofiego et al. (e52) | Stöllberger et al. (22) |
| Klinische Symptome               |                      |                      |                    |                      |                         |
| Herzinsuffizienz                 | 68 %                 | 62,5 %               | 62 %               | 61 %                 | 70 %                    |
| arterielle embolische Ereignisse | 21 %                 |                      | 4 %                |                      |                         |
| Lungenembolien                   | 9 %                  |                      |                    |                      |                         |
| ventrikuläre Thromben            | 9 %                  | 6 %                  |                    |                      | 1 %                     |
| Gesichtsdysmorphien              | 0 %                  |                      |                    |                      |                         |
| neuromuskuläre Störungen         |                      |                      |                    | 9 %                  | 38 %                    |
| Todesfälle                       | 35 %                 |                      | 2 %                |                      | 22 %                    |
| Herztransplantationen            | 12 %                 |                      |                    |                      | 1 %                     |

| Pädiatrische Patienten           |                 |                    |                     |                   |
|----------------------------------|-----------------|--------------------|---------------------|-------------------|
|                                  | Chin et al. (5) | Ichida et al. (10) | Alehan et al. (e53) | Wald et al. (e54) |
| Klinische Symptome               |                 |                    |                     |                   |
| Herzinsuffizienz                 | 63 %            | 30 %               | 55 %                | 54 %              |
| arterielle embolische Ereignisse | 38 %            | 0 %                | 0 %                 | 0 %               |
| Lungenembolien                   | 0 %             | 7 %                | 0 %                 | 0 %               |
| ventrikuläre Thromben            | 25 %            | 0 %                | 0 %                 | 0 %               |
| Gesichtsdysmorphien              | 38 %            | 33 %               |                     | 10 %              |
| neuromuskuläre Störungen         |                 |                    | 0 %                 | 5 %               |
| Todesfälle                       | 38 %            | 7 %                | 22 %                | 14 %              |
| Herztransplantationen            | 0 %             | 4 %                | 0 %                 | 9 %               |

Abbildung 13: Klinische Symptome bei pädiatrischen und erwachsenen Patienten mit LVNC-Kardiomyopathie (Deutsches Ärzteblatt).

### 1.6.6 Diagnostik und Therapie

Bisher gilt für die Diagnose der LVNC die Echokardiographie als Methode der Wahl. Die Diagnose kann auch durch kardiale Magnetresonanztomographie erfolgen (Oechslin *et al.*, 2011). Dabei sollte die Diagnose durch Echokardiographie und MRT übereinstimmen.

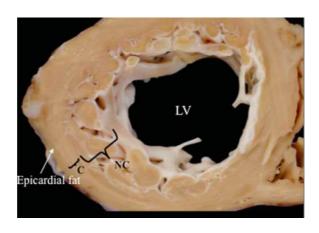


Abbildung 14: Transsektionale Ansicht der dorsalen Hälfte eines Herzens mit LVNC-Symptomatik

C: kompakt-verdichtetes Gebiet, NC: nicht-verdichtetes Gebiet, LV: linker Ventrikel, NC ist im Vergleich zu C zwei bis dreimal so dick. (Oechslin *et al.*,2011).

Bei der LVNC-Diagnose gilt die Faustregel, dass eine verdickte Myokardwand vorhanden sein muss, wobei die Dicke der "Non-Compaction"-Schicht mindestens doppelt so dick sein muss wie die verdichtete Schicht (Abb.14).

Die Therapie umfasst je nach Schweregrad die übliche Behandlung der Herzinsuffizienz, die Behandlung von Arrhythmien unter Einschluss einer ICD (Implantierbarer Kardioverter-Defibrillator) -Implantation bei Risikopatienten und Prävention thromboembolischer Ereignisse mittels Antikoagulationstherapie. Bei Herzinsuffizienz im Endstadium wurden erfolgreiche Herztransplantationen berichtet (Conraads *et al.*, 2001; Strübler *et al.*, 2009).

# 2. Zielsetzung der Arbeit

Die linksventrikuläre Non-Compaction-Kardiomyopathie ist eine noch wenig untersuchte Kardiomyopathie, die jedoch zunehmend als primäre genetische Herzkrankheit an Bedeutung gewinnt. Pathoanatomisch ist LVNC durch eine erhöhte und ausgeprägte Trabekelbildung gekennzeichnet. Charakteristisch ist dabei eine vergrößerte Non-Compaction-Schicht des Myokards im linken Ventrikel. LVNC ist eine genetisch heterogene Krankheit, die unter anderem Mutationen in Sarkomer-Proteinen aufweist.

Myomesin 2 ist ein essentieller Bestandteil der M-Bande, die sich im Zentrum des Sarkomers befindet. Es ist verantwortlich für die korrekte Quervernetzung zwischen Titin und Myosin und somit unverzichtbar für Funktionen des Sarkomers. Für Myomesin 1 (ebenfalls ein essentieller Bestandteil der M-Bande) wurde bereits ein direkter Zusammenhang zwischen definierten Mutationen und Kardiomyopathien nachgewiesen. Diesen Fakten folgend wurde die Hypothese aufgestellt, dass bisher unbekannte Mutationen des MYOM-2-Gens LVNC verursachen oder zumindest begünstigen können.

Das Ziel dieser Arbeit ist es daher durch vergleichende Sequenzanalyse bisher unbekannte Sequenzvariationen im MYOM-2-Gens von, an LVNC erkrankten Patienten zu identifizieren. Zu diesem Zweck wurde die genomische DNA von 52 LVNC-Patienten, auf Variationen im MYOM-2-Gen hin molekulargenetisch analysiert. Die gewonnenen Daten wurden mit einer aus 400 Probanden bestehenden Kontrollgruppe verglichen, um in der Bevölkerung häufig auftretende Variationen von Mutationen unterscheiden zu können, die eine Bedeutung für die Erkrankung haben.

# 3. Materialien und Methoden

# 3.1 Materialien

### 3.1.1 Chemikalien

| Name                       | Hersteller    |
|----------------------------|---------------|
| Agarose Standard           | Roth          |
| Betain                     | Serva         |
| Bromsäure                  | Roth          |
| Bromphenolblau             | Pierce        |
| EDTA                       | Pierce        |
| Ethidiumbromid             | Roth          |
| Gelgreen                   | Biotium       |
| Glycerin                   | Serva         |
| HI-DI Formamid             | Merck         |
| HPLC Wasser                | Roth          |
| Salzsäure                  | Merck         |
| Sephadex TM G-50 Superfine | GE Healthcare |
| Tris (Base)                | Roth          |
| Xylencyanol                | Pierce        |

### 3.1.2 Enzyme und Nukleotide

| 2.1.2 Elley life that I think out the           |            |
|-------------------------------------------------|------------|
| Name                                            | Hersteller |
| Fast AP TM Thermosensitive Alkaline Phosphatase | Fermentas  |
| DNA Primerpaare (Anhang, Tabelle B)             | Bio TeZ    |
| dNTP-Mix (dATP, dGTP, dCTP, dTTP)               | Epicentre  |
| Exonuklease                                     | BioLabs    |

### 3.1.3 Molekulargewichtsmarker

| Name                                 | Hersteller |
|--------------------------------------|------------|
| DNA-Molekulargewichtsmarker Typ VIII | Fermentas  |

### 3.1.4 Kits

# PCR Kits (Stratec)

- 10x PCR-Probenpuffer (100mM Tris-HCl pH 8,3; 500mM KCl)
- MgCl<sub>2</sub> (25mM)
- Taq-DNA-Polymerase (5U/μL)

# Big Dye Terminator Kit v1.1 (ABI-Prism)

- Big Dye Ready Reaction Mix
- 5x Sequenzierungspuffer

### 3.1.5 Verbrauchsmaterialien

| Name                                           | Hersteller         |
|------------------------------------------------|--------------------|
| AB gene ® PCR Plates                           | Thermo Scientific  |
| 96-Well Reaction Plate Micro Amp <sup>TM</sup> | Applied Biosystems |
| 96-Well Assay System Multi Screen ®            | Millipore          |
| Cellophanfolie                                 | Folia/Festa        |
| Einführhilfe für Sephadex                      | GE Healthcare      |
| Erlenmeyerkolben                               | Carl Zeiss Jena    |
| Handschuhe Prima Profi Verde                   | Sänger             |
| Handschuhe Rotiprotect Nitril                  | Roth               |
| Iso Freez Rack 90                              | Roth               |
| Messzylinder (50ml, 250ml)                     | Carl Zeiss Jena    |
| Packet-Klebeband                               | Tesa               |
| Parafilm                                       | Roth               |
| Multiply μStrip 0,2ml Kette                    | Sarstedt           |
| Multiply 8er Deckelkette, flach                | Sarstedt           |
| Pipettenspitzen                                | Biosphere          |
| Reaktionsgefäß 2ml, 1.5ml, 0.6 ml              | Biozym             |

### 3.1.6 Geräte

| Name                               | Hersteller                |
|------------------------------------|---------------------------|
| ABI Prism 3730 DNA Analyzer        | Applied Biosystems        |
| Digital Graphic Printer UP D895    | Sony                      |
| Eismaschine AF-100                 | Scotsman                  |
| Elektrophorese-Kammer Multiphor II | Pharmacia                 |
| Flachbettgelkammer Horizon 58      | Gibco BRL                 |
| Fotoanlage Herolab E.A.S.Y System  | Herolab Enhanced Analysis |

| Gelkammer Horizon® 58            | Biometra                                                                                                                 |
|----------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Mikrowelle 800                   | Serevin                                                                                                                  |
| Netzteil Biometra Power Pack P25 | Biometra                                                                                                                 |
| Picofuge                         | Stratagene                                                                                                               |
| Pipetten*                        | Abimed, Biohit, Eppendorf                                                                                                |
| 8-Kanal Pipetten**               | Biozym, Biohit, Proline Plus                                                                                             |
| Thermocycler UNO                 | Biometra                                                                                                                 |
| Thermocycler T Professional      | Biometra                                                                                                                 |
| Peltier Thermal Cycler ***       | MJ-Research                                                                                                              |
| Thermostat DRI-Block DB-2A       | Techne                                                                                                                   |
| UV-Lampe Bio Doc Analyze         | Biometra                                                                                                                 |
| Vortex REAX 2000                 | Heidolph                                                                                                                 |
| Waage 510-37                     | Kern                                                                                                                     |
| Zentrifuge Rotanta 460R          | Hettich Zentrifugen                                                                                                      |
| 1<br>1<br>2                      | $ \begin{array}{lllll} 0,1-10 & \mu 1 \\ 2-20 & \mu 1 \\ 0-100 & \mu 1 \\ 0-200 & \mu 1 \\ 00-1000 & \mu 1 \end{array} $ |
| 1 1                              | ,5-10 μl<br>-20 μl                                                                                                       |
| P                                | TC-100<br>TC-200<br>TC-225                                                                                               |

#### 3.1.7 Software

| Name                   | Hersteller             |
|------------------------|------------------------|
| Sequencher 4.10.1      | Gene Codes Corporation |
| OLIGO <sup>®</sup> 4.0 | Bio TeZ GmbH           |

#### 3.1.8 Patientenkollektiv

Grundlage der Arbeit sind DNA-Proben von 52 unverwandten LVNC-Patienten. Die Diagnose ist nach den etablierten Kriterien gestellt worden. Für jeden Patienten lag vor Beginn der Versuche eine Einwilligungserklärung zur Teilnahme an der Studie vor. Ein positives Votum der Ethikkommission liegt ebenfalls vor.

Die Kontrollen stammen aus einem Pool von 400 anonymisierten Individuen, die nicht an einer Kardiomyopathie erkrankt waren und deren Herz ohne pathologischen Befund war.

### 3.2 Methoden

#### 3.2.1 DNA-Extraktion

Die extrahierte DNA der Patienten lag vor. Sie wurde vor Beginn der Arbeit aus Vollblut durch das Gerät AUTOPURE LS der Firma QIAGEN von Mitarbeitern des Labors gewonnen. Die DNA-Konzentration konnte mittels Agarosegelelektrophorese bestimmt werden. Hierzu wurde 1,5%ige Agarose verwendet und ein DNA-Standard der Konzentration 25ng/μl mitgeführt. Die Proben wurden bei -20°C aufbewahrt und jede Probe wurde mit einer vierstelligen Zahl.

### 3.2.2 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurde 1984 von Kary Mullis entwickelt. Sie ermöglicht eine Vervielfältigung bestimmter Sequenzabschnitte aus geringen Mengen genetischen Materials. Innerhalb kurzer Zeit kann man aus einem DNA-Fragment durch enzymatische Synthese große Menge einer spezifischen Gensequenz amplifizieren.

Die enzymatische Vervielfältigung besteht aus 3 Schritten:

### **Denaturierung:**

Bei 94°C wird der DNA-Doppelstrang denaturiert. Es entstehen zwei Einzelstränge (Abb.15).

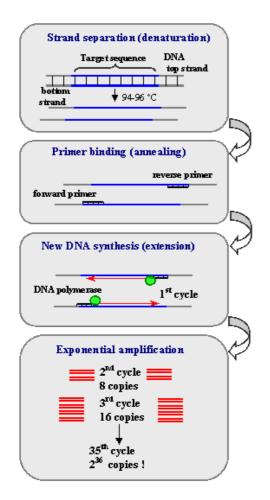
#### **Annealing:**

Bei einer Temperatur zwischen 55°C und 70°C hybridisieren die Oligonukleotidprimer an die komplementäre Sequenz. Um eine spezifische Gensequenz zu amplifizieren, werden Primer benötigt, die an den äußeren Enden des zu amplifizierenden genetischen Abschnitts (Amplikon) binden (Abb.15).

# **Elongation:**

Danach wird die Temperatur auf 72°C erhöht, wobei der Primer verlängert wird, bis eine doppelsträngige exakte Kopie der ursprünglichen DNA vorliegt (Abb.15).

Für die PCR werden neben dem Template, den Primern und der Polymerase zusätzlich noch Puffer, MgCl<sub>2</sub> und Desoxynukleotid-Triphosphate dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) benötigt.



# Abbildung 15: Schematische Darstellung des PCR-Zyklus (NCBI online)

Die entstandenen DNA-Stränge bilden die Template-DNA für den nächsten Zyklus und die vorhandene DNA wird exponentiell vermehrt.(Details siehe Text)

Somit hat man in einem Zyklus die Zahl der gewünschten DNA-Sequenz verdoppelt. Durch mehrere Zyklen gewinnt man eine vielfache Menge der gewünschten DNA. Die PCR besteht normalerweise aus einer Serie von 30 bis 40 Zyklen. Sie endet mit einer verlängerten Elongationsphase um alle verbleibenden Einzelstränge zu komplettieren (Tab.1).

Die Forward- und Reverse-Primer wurden mit Hilfe des OLIGO® 4.0 Primerdesign-Programms der Firma Bio TeZ Berlin-Buch GmbH designet. Die Konzentration der Primer betrug 50 pmol/μl. Die Primer wurden im Verhältnis von 1:10 mit destilliertem Wasser verdünnt. Zur Optimierung der PCR wurde mit der Hilfe einer Gradienten-PCR die geeignete Annealing-Temperatur für das jeweilige Primerpaar mit der Endkonzentration 5 pmol/μl bestimmt (Tab.2). Bei manchen Exons (z.B. Exon 28 und 31) war es notwendig dem Master-Mix Enhancer, wie Betain (*N*,*N*,*N*-Trimethylammonioacetat) bzw. DMSO (Dimethylsulfoxid) zuzufügen, um die Spezifität der PCR zu erhöhen (Tab.3). Im Anhang ist eine Liste mit den Primern, ihren Sequenzen und ihrer optimalen Annealing-Temperatur sowie der PCR-Zyklenzahl zu finden.

Tabelle 1: PCR Programm

| Schritt | Temperatur [°C] | Zeit [min] | Funktion                      |
|---------|-----------------|------------|-------------------------------|
| 1       | 94              | 5:00       | Anfangsdenaturierung          |
| 2       | 94              | 00:30      | Denaturierung                 |
| 3       | s. Exon Tab     | 00:30      | Primerhybridisierung          |
| 4       | 72              | 1:30       | Primerextension               |
| 5       | 72              | 5:00       | abschließende Primerextension |
| 6       | 4               | $\infty$   | Kühlung                       |

**Tabelle 2: PCR Standard Ansatz** 

| Komponenten                     | Konzentration | Volumen[µl] | Funktion                           |
|---------------------------------|---------------|-------------|------------------------------------|
| dH <sub>2</sub> O               |               | 17,5        |                                    |
| NH <sub>4</sub> Reaktionspuffer | 10 x          | 2,5         | Einstellung des optimalen pH-Werts |
| MgCl <sub>2</sub>               | 50 mmol/l     | 1,5         | Notwendig für Taq-Aktivität        |
| Forward-Primer                  | 5 pmol/μl     | 1,0         | Spez. Polymerase-Startpunkt        |
| Reverse-Primer                  | 5 pmol/μl     | 1,0         | Spez. Polymerase-Startpunkt        |
| dNTP-Mix                        | 25 mmol/l     | 0,3         | DNA-Bausteine                      |
| Taq-DNA-Polymerase              | 5 U/μl        | 0,3         | Enzym                              |
| DNA                             | 25 ng/μl      | 1,0         |                                    |

Der Mastermix wurde für das Gesamtvolumen der Patientenproben für eine PCR berechnet. Dann wurde in jedes Segment der Softstrips (PCR-Reaktionsgefäß) in Kühlblöcken 24  $\mu$ l Mastermix und 1  $\mu$ l DNA gegeben. Als Negativ-Kontrolle diente ein Strip nur mit Mastermix ohne DNA. Danach wurden die Tubes durchmischt, zentrifugiert und anschließend in den Thermocycler gestellt.

Tabelle 3: PCR Ansatz mit Betain- und DMSO-Zusatz

| Komponenten                     | Konzentration | Volumen[µl] | Funktion                               |
|---------------------------------|---------------|-------------|----------------------------------------|
| dH <sub>2</sub> O               |               | 14,9        |                                        |
| Betain/DMSO                     |               | 2,5         | Zur Verbesserung der PCR-<br>Ausbeute  |
| NH <sub>4</sub> Reaktionspuffer | 10 x          | 2,5         | Einstellung des optimalen pH-<br>Werts |
| MgCl <sub>2</sub>               | 50 mmol/l     | 1,5         | Notwendig für Taq-Aktivität            |
| Forward-Primer                  | 5 pmol/μl     | 1,0         | Spez. Polymerase-Startpunkt            |
| Reverse-Primer                  | 5 pmol/μl     | 1,0         | Spez. Polymerase-Startpunkt            |
| dNTP-Mix                        | 25 mmol/l     | 0,3         | DNA-Bausteine                          |
| Taq-DNA-Polymerase              | 5 U/μl        | 0,3         | Enzym                                  |
| DNA                             | 25 ng/μl      | 1,0         |                                        |

Anschließend wurde bei der ermittelten Annealing-Temperatur und dem standardmäßigen Master-Mix-Ansatz die PCR für Exon 28 und 31 mit NC Proben durchgeführt.

### 3.2.3 Elektrophorese mittels Agarosegel

Die Qualität des PCR-Produktes wurde mittels Agarosegel-Elektrophorese geprüft. Es wurde ein 3%-iges Agarosegel hergestellt (Tab.4). Die Komponenten wurden in einem Erlenmeyerkolben zusammengefügt, durchmischt und in der Mikrowelle zum Kochen gebracht.

Tabelle 4: 3% iges Agarosegel (1 Gel)

| Komponenten    | Volumen |
|----------------|---------|
| Agarose Pulver | 3 g     |
| 1xTBE Puffer   | 100 ml  |
| Ethidiumbromid | 5 μl    |

Zu dieser Lösung wurde 0,5 μl Ethidiumbromid (ein Fluoreszenzfarbstoff) hinzugefügt und anschließend in die Elektrophoresekammer gegossen. Die Auspolymerisationszeit betrug etwa eine Stunde. In die oberste Gelkammer wurden 2 μl DNA-Molekulargewichtsmarker pUC Typ VIII der Firma MBI Fermentas (Abb.16) und 2 μl Auftragungspuffer pipettiert.

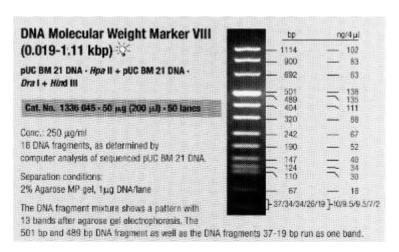


Abbildung 16: Molekulargewichtsmarker VIII

Die restlichen Gelkammern wurden mit einer Mischung aus 2  $\mu$ l PCR-Produkt und 2  $\mu$ l Auftragungspuffer (Tab.5) befüllt.

Tabelle 5: Auftragspuffer

| Komponenten    | Volumen |
|----------------|---------|
| Glycerin       | 3,0 ml  |
| HPLC-Wasser    | 7,0 ml  |
| Bromphenolblau | 0,025 g |
| Xylencyanol    | 0,025 g |

Als Laufpuffer diente 1xTBE-Puffer. Dazu wurde eine 5xTBE-Stammlösung (Tab.6) im Verhältnis von 1:5 mit destilliertem Wasser verdünnt.

Tabelle 6: 5xTBE-Puffer für 1 Liter

| Komponenten           | Volumen |
|-----------------------|---------|
| dH <sub>2</sub> O     | 1000 ml |
| TRIS                  | 54 g    |
| Borsäure              | 27,5 g  |
| 0,5 mol/l EDTA-Lösung | 20,0 ml |

Die Gelkammer wurde an das Elektrophorese-Netzgerät PS 9000 TC für 45 min unter 80V Spannung angeschlossen. So bewegte sich das DNA-Fragment von der Kathode zur Anode. Anschließend wurde das Agarosegel zum Betrachten der Banden unter eine UV-Lampe gelegt, fotografiert und gespeichert.

Mit Hilfe des Fluoreszenz-Farbstoffes konnte man die Banden der DNA-Fragmente sichtbar machen. Die Größe des amplifizierten DNA-Fragments wurde im Vergleich mit den Banden des Molekulargewichtsmarker ermittelt (Abb.16). Für weitere Schritte wurden nur Proben mit klaren Banden verwendet. Schwache Proben wurden erneut amplifiziert.

#### 3.2.4 Enzymatische Aufreinigung

Nach der erfolgreichen PCR wurden die Proben enzymatisch aufgereinigt. Dafür wurden die Enzyme Exonuklease-1 der Firma BIOLABS und Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP) der Firma PROMEGA, sowie HPLC-Wasser (HPLC: high performance liquid chromatography) verwendet (Tab.7). Nachdem der Ansatz (Tab.8) auf Eisblöcken in Strips pipettiert und zentrifugiert wurde, folgte die enzymatische Aufreinigung des PCR-Produkts im Thermocycler für 30 min bei 37°C und 15 min bei 72°C zur Entfernung nicht gebundener Primer und dNTPs.

**Tabelle 7: Enzymatische Aufreinigung** 

| Komponenten                 | Hersteller |
|-----------------------------|------------|
| Exonuklease 1               | BioLabs    |
| Shrimp Alkaline Phosphatase | Pomega     |
| dH <sub>2</sub> O           |            |

Tabelle 8: Ansatz für die enzymatische Aufreinigung

| Komponenten                          | Volumen (µl) |
|--------------------------------------|--------------|
| Exonuklease-1 (20 U/μl)              | 0,09         |
| Shrimp Alkaline Phosphatase (1 U/µl) | 0,32         |
| dH <sub>2</sub> O                    | 2,59         |
| PCR-Produkt                          | 7,0          |

#### 3.2.5 Sequenzierung

Dye® Für Sequenzierungsmastermix Big Terminator-Kit wurde v1.1, 5xSequenzierungspuffer, Forward-Primer, Reverse-Primer und HPLC-Wasser verwendet. Die Reaktionsgefäße wurden mit 2 µl enzymatisch gereinigtem PCR-Produkt und 8 µl des Sequenzierungsmastermixes befüllt und zentrifugiert. Anschließend wurde im Thermocycler Sequenzierungs-Programm gestartet. Die Zusammensetzung Sequenzierungsmastermix und das Cyclerprogramm zum Sequenzieren sind den Tabellen 9 bzw. 10 zu entnehmen.

Tabelle 9: Ansatz für Cycle-Sequencing

| Chemikalien                            | Volumen (µl) |
|----------------------------------------|--------------|
| 5x Sequenzier-Puffer                   | 1,75         |
| Big-Dye-Terminator v 1.1               | 0,50         |
| dH <sub>2</sub> O                      | 4,75         |
| Primer (Forward oder Reverse)          | 1,00         |
| Enzymatisch aufgereinigtes PCR-Produkt | 2,00         |

 $Tabelle\ 10:\ Thermocycler programm\ zum\ Sequenzieren$ 

(Schritt 2,3,4 wird in 37 Zyklen wiederholt)

| Schritt | Temperatur (°C) | Zeit     | Reaktion             |
|---------|-----------------|----------|----------------------|
| 1       | 96              | 1 min    | Anfangsdenaturierung |
| 2       | 96              | 25 sec   | Denaturierung        |
| 3       | 50              | 30 sec   | Primerhybridisierung |
| 4       | 60              | 4 min    | Primerextension      |
| 5       | 4               | $\infty$ | Kühlung              |

Mit Hilfe der Didesoxymethode nach Sanger wurde das gereinigte PCR-Produkt sequenziert (Abb.17). Am zum sequenzierenden DNA-Einzelstrang bindet der Primer, die dNTPs werden hierbei hybridisiert. Big-Dye-Terminator v1.1 enthält neben dNTPs auch eine AmpliTaq-DNA-Polymerase und fluoreszenz-markierte ddNTPs. Den ddNTPs (ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTP) fehlt die 3'-Hydroxygruppe. Der Einbau eines ddNTPs verursacht einen Kettenabbruch der Polymerisationsreaktion. So entstehen DNA-Fragmente mit unterschiedlichen Längen, die sich um je eine Base unterscheiden. Mit einem entsprechenden Programm (Tab.9) wird das gereinigte PCR-Produkt endgültig sequenziert.

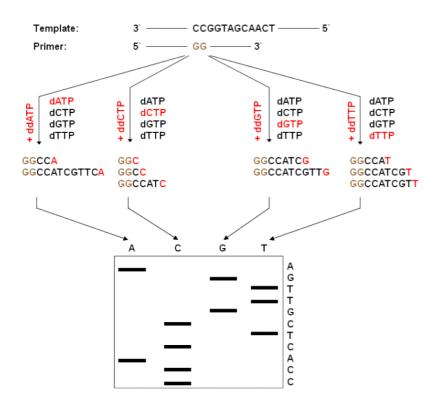


Abbildung 17: Prinzip der DNA-Sequenzierung nach der Didesoxy-Methode nach Sanger (Lehrbuch der Biochemie, 2002, D. Voet , J. G. Voet, C. G. Pratt)

### Sequenzierung des Exon 14

Die PCR des Exon 14 wurde anfangs mit dem Primer 14.4 durchgeführt. Nach wiederholten Misserfolgen wurde zum Sequenzieren der Primer 14.2 verwendet. Dies führte zu einer saubereren Sequenzierung des Exons 14.

### 3.2.6 Sephadexplatten

Zur Herstellung der Sephadexplatten wurde das Millipore MultiScreen<sup>®</sup> Assay System mit Hilfe eines Füllblocks mit "Sephadex<sup>TM</sup> G-50 Superfine" befüllt. Danach wurden in jedes Well 300 μl HPLC-Wasser pipettiert. Die Wells wurden über Nacht im Kühlschrank bei 4°C aufbewahrt. Am nächsten Tag wurde das Wasser aus dem Well mit Hilfe der Zentrifuge für 5 Minuten bei 1000g (g: Erdbeschleunigung) in eine Abfallplatte ausgetrieben. Die Wells wurden erneut mit 150 μl HPLC-Wasser beschichtet und unter denselben Bedingungen zentrifugiert. Anschließend wurden jeweils 10 μl sequenziertes PCR-Produkt in die Sephadex-Platte und 13 μl HiDi-Formamid je Well in eine Sequenzierungsauffangplatte pipettiert. Durch einen letzten Zentrifugationsschritt wurde das gereinigte Produkt mit dem HiDi-Formamid vereint. Die Auffangplatte wurde mit einem Gummideckel verschlossen, beschriftet und zur Sequenzierung geschickt.

#### Material & Methoden

#### 3.2.7 Auswertung der Sequenzierung

Die Sequenzdaten wurden im Sequenzer ABI 3730 automatisch analysiert. Die Sequenzdaten wurden mit Hilfe des Computerprogramms Sequencher 4.10.1 ausgewertet. Mit Hilfe dieses Programms wurden die Elektropherogramme des Sequenzers mit der Referenz-Sequenz aus der Ensembl-Datenbank verglichen um Variationen zu identifizieren.

### 3.2.8 Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus-Analyse (RFLP-Analyse)

Restriktionsanalysen sind eine weitere Methode um Variationen direkt nachzuweisen. Die amplifizierte DNA wird mit hoch spezifischen Endonukleasen in definierte Fragmente gespalten. Je nach Anzahl und Lage der vorhandenen Erkennungssequenz entstehen nach dem enzymatischen Verdau Fragmente von bestimmter Anzahl und Größe. Anschließend werden die verschiedenen Fragmente ihrer Länge nach gelelektrophoretisch aufgetrennt. Verändert sich die Erkennungssequenz durch einen Basenaustausch, wird diese durch das Enzym nicht mehr erkannt. So entstehen andere Schnittmuster. Mit Hilfe des Programmes Sequencher 4.10.1 wurden geeignete Restriktionsschnittstellen in Fragmenten gesucht.

Nur für die Variation Ala1045Ser im Exon 25 (Patient NC-25) konnten zwei Enzyme (HinfI und TfiI) als mögliche Restriktionsenzyme ermittelt werden. Als Wildtyp-Kontrollen wurden Patient NC-23 und NC-9 gewählt. Ein Mastermix (Tab.11) mit den jeweiligen Restriktionsenzymen nach Vorgaben der Herstellers (Tab.12 und 13) wurde angefertigt. Anschließend wurden die Proben für 2 Stunden in den Thermocycler bei 37°C inkubiert und zuletzt für 20 min bei 80°C inaktiviert.

**Tabelle 11: Pufferkomponenten** 

| NE-Buffer 4 (10x) |      |  |  |
|-------------------|------|--|--|
| Kaliumacetat      | 50mM |  |  |
| Tris-Acetat       | 20mM |  |  |
| Magnesiumacetat   | 10mM |  |  |
| Dithiothreitol    | 1mM  |  |  |

#### Material & Methoden

Tabelle 12: HinfI Verdau

| Reagenz            | Volumen [µl] x1 | Volumen [µl] x10 |
|--------------------|-----------------|------------------|
| HPLC-Wasser        | 5,6             | 56               |
| NEBuffer 4 (x10)   | 1,0             | 10               |
| HinfI (10000 U/ml) | 0,4             | 4                |
| PCR-Produkt        | je 3            | je 3             |

Tabelle 13: Tfil Verdau

| Reagenz          | Volumen [µl] x1 | Volumen [µl] x10 |
|------------------|-----------------|------------------|
| HPLC-Wasser      | 5,2             | 52               |
| NEBuffer 4 (x10) | 1,0             | 10               |
| TfiI (5000 U/ml) | 0,8             | 8                |
| PCR-Produkt      | je 3            | je 3             |

Die verdauten PCR-Produkte wurden durch eine Agarosegelelektrophorese, wie in Abschnitt 3.2.3 erläutert, aufgetrennt. Als Kontrolle wurden ein Marker Typ V, ein unverdautes PCR-Produkt, die Variation sowie der Wildtyp mitgeführt.

Bei den anderen Variationen waren die Restriktionsenzyme sehr unspezifisch, deshalb wurden diese nicht enzymatisch verdaut.

#### Enzymatischer Verdau des Exons 25 mit Hinfl

Das Enzym HinfI schneidet das 540 bp große Fragment des Exon 25 im Wildtyp an zwei Stellen. Somit erhalten wir drei unterschiedlich große Fragmente. Die erste Schnittstelle ist bei 207 bp, die zweite bei 422 bp. HinfI schneidet die Mutante an 3 Stellen und es entstehen 4 Fragmente. Die erste Schnittstelle ist bei 207 bp, die zweite Schnittstelle bei 335 bp und die dritte ist bei 422 bp.

#### Enzymatischer Verdau des Exons 25 mit Tfil

Das Enzym TfiI schneidet das 540 bp große Fragment des Exons 25 im Wildtyp an einer Stelle. Somit erhalten wir zwei unterschiedlich große Fragmente. Die Schnittstelle ist bei 207 bp. Bei der Mutation schneidet TfiI das Fragment an zwei Stellen und es entstehen drei Fragmente. Die erste Schnittstelle ist bei 207 bp, dann folgt die zweite bei 335 bp.

Die in diesem Abschnitt vorgestellten Ergebnisse basieren auf molekulargenetischen Analysen des Myomesin-2-Gens. Das genetische Material stammte dabei sowohl von Patienten die eine LVNC-Kardiomyopathie aufwiesen als auch von gesunden Individuen zur Kontrolle.

## 4.1 PCR-Ergebnisse und Optimierungen

Die Mehrzahl der Exons konnten mit den bereits im Labor etablierten PCR-Protokollen und ohne weitere Optimierungen gut amplifiziert werden (Tab.1,Tab.2).

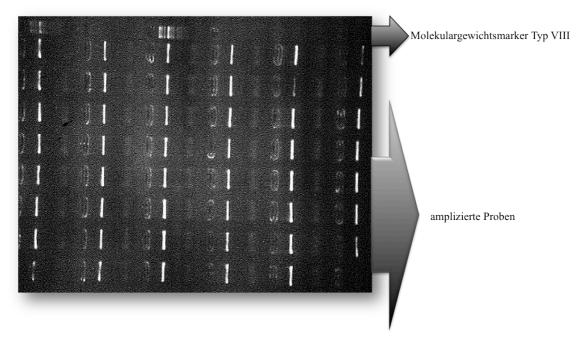


Abbildung 18: Gelelektrophorese-Ergebnisse zur Überprüfung der PCR am Beispiel von Exon 20

Die Exons 19, 20, 21, 28 und 33+34 erforderten den Zusatz von Betain und das Exon 31 den Zusatz vom Dimethylsulfoxid (DMSO) zum PCR-Ansatz (Tab.3).

Die Amplifizierung des Exon 14 durch den Primer MYOM-2-14.4 erzeugte neben des gewünschten spezifischen Produkts auch mehrere unspezifische Produkte. Um Fehler in der Sequenzierung zu minimieren wurde hier statt des Primers MYOM-2-14.4 das Primer-Paar MYOM-2-14.2-F und MYOM-2-14.2-R genutzt. Diese binden weiter "innen" als das Primer-Paar MYOM-2-14.4-F und MYOM-2-14.4-R. Durch den Einsatz der nested-Primer MYOM-2-14.2-F/R konnte die Spezifität der Sequenzierungsreaktion deutlich erhöht werden.

## 4.2 Sequenzierungsergebnisse

Die Fragmente wurden wie in Abschnitt 3.2.5 beschrieben erfolgreich sequenziert.

Die gefundenen Variationen wurden mit der SNP-Datenbank von NCBI und der Ensembl-Datenbank verglichen und anschließend in Untergruppen bekannt/unbekannt sowie synonym/nicht-synonym unterteilt. Aus dieser Unterteilung ergeben sich die folgenden vier Gruppen: bekannt/synonym bzw. unbekannt/synonym bzw. bekannt/nicht-synonym bzw. unbekannt/nicht-synonym. Die bekannten Variationen sind in der SNP-Datenbank mit einer entsprechenden SNP-ID gekennzeichnet. Von besonderen Interesse ist die Gruppe von unbekannt/nicht-synonym, als neue Variationen, bei denen ein Aminosäureaustausch stattfindet.

## 4.3 Gefundene Variationen in Myomesin 2

Jedes der 37 Exons konnte bei allen 52 Patientenproben erfolgreich sequenziert werden. Bei den meisten Ansätzen wurde nur der Forward-Primer zum sequenzieren verwendet. Bei den Exons 10, 12, 13, und 20 wurde zusätzlich eine Sequenzierung mit Reverse-Primern vorgenommen, da der Beginn des Fragmentes nicht auswertbar war, bzw. bei Exon 14 ein nested-Primer-Paar benutzt, um unspezifische Produkte auszuschließen. Eine wiederholte Sequenzierung mit Reverse-Primern wurde ebenfalls bei Exons, die eine unbekannte Variation zeigen vorgenommen, um diese sicherzustellen. Exons, die unbekannte Sequenzvariationen aufwiesen, wurden zur Bestätigung wiederholt und auch zusätzlich mit Reverse-Primern sequenziert.

#### 4.3.1 Bekannte Variationen

Durch einen Abgleich der erhaltenen Ergebnisse mit der SNP-Datenbank konnte zwischen bereits bekannten und bisher unbekannten Variationen unterschieden werden. In diesem Abschnitt werden die bekannten Variationen vorgestellt.

#### 4.3.1.1 Synonyme Sequenzveränderungen

Es wurden Variationen in den Exons 15, 16, 20, 21, 22, 25 und 36 gefunden. Trotz veränderter Codons durch vertauschte Basen innerhalb der genomischen Sequenz kam es zu keiner Veränderung der Aminosäuresequenz im Protein Myomesin 2. Es wurden insgesamt 12 bekannte synonyme Variationen identifiziert (Tab.14).

Tabelle 14: Alle gefundenen synonymen bekannten Variationen in MYOM-2

| Exon | Position in cDNA | db SNP      | Aminosäure-<br>austausch | Hetero-/<br>Homozygot | Kodon                                         | Anzahl der<br>Patienten mit<br>der Variation |
|------|------------------|-------------|--------------------------|-----------------------|-----------------------------------------------|----------------------------------------------|
| 15   | c.1647G>C        | rs2294061   | Ser549Ser                | heterozygot           | TC <u><b>G</b></u> →TC <u>C</u>               | 6 (11,5 %)                                   |
| 10   | c.1689G>A        | rs2294062   | Thr563Thr                | heterozygot           | $AC\underline{G} \rightarrow AC\underline{A}$ | 2 (3,8 %)                                    |
| 16   | c.1836T>G        | rs17064685  | Pro612Pro                | heterozygot           | CC <u>T</u> →CC <u>G</u>                      | 3 (5,8 %)                                    |
|      | c.1953C>T        | rs2235122   | Ala651Ala                | heterozygot           | GC <u>C</u> →GC <u>T</u>                      | 8 (15,4 %)                                   |
| 20   | c.2586A>C        | rs4876227   | Val862Val                | homozygot             | GT <u>A</u> →GT <u>C</u>                      | 1 (1,9 %)                                    |
| 21   | c.2682C>T        | rs 2294071  | Gly894Gly                | heterozygot           | GG <u>C</u> →GG <u>T</u>                      | 7 (13,5 %)                                   |
| 22   | c.2769A>G        | rs17684416  | Gln923Gln                | heterozygot           | CA <u>A</u> →CA <u>G</u>                      | 6 (11,5 %)                                   |
| 22   | c.2874C>T        | rs3817705   | Ile958Ile                | heterozygot           | AT <u>C</u> →AT <u>T</u>                      | 19 (36,5 %)                                  |
| 25   | c.3156C>T        | rs 2280897  | Asp1052Asp               | heterozygot           | AA <u>C</u> →AA <u>T</u>                      | 8 (15,4 %)                                   |
| 36   | c.4056C>T        | rs 35321833 | Asp1352Asp               | heterozygot           | GA <u>C</u> →GA <u>T</u>                      | 1 (1,9%)                                     |

#### 4.3.1.2 Nicht-synonyme Sequenzveränderungen

Im Gegensatz zu der Gruppe der synonymen Variationen manifestieren sich die Veränderungen der Nukleotidsequenz in der Gruppe der nicht-synonymen Variationen in einem Austausch der Aminosäure in der Proteinsequenz.

Derartige Variationen wurden in zehn der 37 untersuchten Exons gefunden, wobei die Häufigkeit der einzelnen Variationen innerhalb des Probandenpools stark variierte (1,9-30,8%) (Tab.15). Der Aminosäureaustausch Asn869Ser im Exon 20 war dabei mit 31% Häufigkeit am prominentesten. Die gefundenen Variationen lagen alle in heterozygoter Form vor.

Tabelle 15: Alle gefundenen bekannten/nicht-synonymen Variationen in MYOM-2

| Exon | Position in cDNA | db SNP      | Aminosäure<br>-austausch | hetero-/<br>homozygot | Kodon                                          | Anzahl der<br>Patienten mit der<br>Variation |
|------|------------------|-------------|--------------------------|-----------------------|------------------------------------------------|----------------------------------------------|
| 2    | c.98C>A          | rs35578989  | Ala33Glu                 | heterozygot           | G <u>C</u> G→G <u>A</u> G                      | 3 (5,8 %)                                    |
| 3    | c.241G>A         | rs35985218  | Glu81Lys                 | heterozygot           | <u>G</u> AG→ <u>A</u> AG                       | 2 (3,8 %)                                    |
| 3    | c.260G>T         | rs35022521  | Ser87Ile                 | heterozygot           | A <u>G</u> C→A <u>T</u> C                      | 1 (1,9%)                                     |
| 5    | c.545C>T         | rs17064618  | Thr182Met                | heterozygot           | A <u>C</u> G→A <u>T</u> G                      | 4 (7,7%)                                     |
| 10   | c.1087G>A        | rs34316994  | Ile363Val                | heterozygot           | <u><b>G</b></u> TC <b>→</b> <u><b>A</b></u> TC | 6 (11,5%)                                    |
| 16   | c.1993G>A        | rs61732775  | Gly665Ala                | heterozygot           | <u>G</u> GA→ <u>A</u> GA                       | 1 (1,9%)                                     |
| 17   | c.2101G>A        | rs35335787  | Val701Ile                | heterozygot           | <u><b>G</b></u> TC <b>→</b> <u><b>A</b></u> TC | 4 (7,7%)                                     |
| 18   | c.2170G>A        | rs79925336  | Gly724Ser                | heterozygot           | <u>G</u> GC→ <u>A</u> GC                       | 1 (1,9%)                                     |
| 20   | c.2606 A>G       | rs968381    | Asn869Ser                | heterozygot           | A <u>A</u> C→A <u>G</u> C                      | 16 (30,8%)                                   |
| 24   | c.1568 G>A       | rs 75318724 | Ser523Asn                | heterozygot           | A <b>G</b> C→A <b>A</b> C                      | 1 (1,9 %)                                    |
| 29   | c.3503T>C        | rs17854780  | Val1168Ala               | heterozygot           | G <u>T</u> T <b>→</b> G <u>C</u> T             | 8 (15,4%)                                    |

#### 4.3.2 Unbekannte Variationen

Im Zuge dieser Arbeit wurden auch bisher unbekannte Variationen innerhalb des Myomesin-2-Gens entdeckt (Abb.31). Die folgenden Abschnitte beschreiben diese Variationen.

#### 4.3.2.1 Synonyme Sequenzveränderungen

Zwei der untersuchten Exone (2 und 19) wiesen bisher unbekannte Variationen auf, die jedoch nicht zu einer Veränderung der Aminosäuresequenz führen. Diese Variationen lagen jeweils heterozygot vor und wurden jeweils bei einem Probanden nachgewiesen (Tab.16).

Tabelle16: Alle gefundenen unbekannten/ synonymen Variationen in MYOM-2

| Exon | Position in c.DNA | Aminosäure-<br>austausch | hetero-<br>/homozygot | Kodon                    | Anzahl der<br>Patienten mit<br>der Variation |
|------|-------------------|--------------------------|-----------------------|--------------------------|----------------------------------------------|
| 2    | c.99G>C           | Ala33Ala                 | heterozygot           | GC <u>G</u> →GC <u>C</u> | 1 (1,9 %)                                    |
| 19   | c.2358G>T         | Ala786Ala                | heterozygot           | GC <u>G</u> →GC <u>T</u> | 1 (1,9 %)                                    |

#### 4.3.2.2 Nicht-synonyme Sequenzveränderungen

Unbekannte und nicht-synonyme Variationen sind am interessantesten und werden im Folgenden beschrieben.

In den Exons 14, 20, 25 und 26 wurden fünf derartige Variationen gefunden (Tab.17).

| Exon | Position in c.DNA | Aminosäure-<br>austausch | hetero-/<br>homozygot | Kodons                   | Anzahl der Patienten mit der Variation |
|------|-------------------|--------------------------|-----------------------|--------------------------|----------------------------------------|
| 14   | c.1540 C>T        | Pro514Ser                | heterozygot           | <u>C</u> CC→ <u>T</u> CC | 1 (1,9%)                               |
| 14   | c.1622 C>T        | Pro541Leu                | heterozygot           | CCG→CTG                  | 1 (1.9%)                               |

heterozygot

heterozygot

heterozygot

 $GCC \rightarrow GTC$ 

 $\underline{\mathbf{G}}$ CC $\rightarrow \underline{\mathbf{T}}$ CC

G<u>G</u>A→G<u>C</u>A

1 (1,9%)

1 (1,9%)

1 (1,9%)

Tabelle 17: Alle gefundenen unbekannten/nicht-synonymen Variationen in MYOM-2

Ala835Val

Ala1045Ser

Gly1107Ala

### Exon 14

20

25

26

c.2504 C>T

c.3133G>T

c.3320G>C

Im Exon 14 wurden 2 neue Variationen gefunden. Die Variation c.1540C>T ist heterozygot und führte zum Austausch der unpolaren und hydrophoben Aminosäure Prolin gegen das polare und neutrale Serin (Pro514Ser). Die Variation c.1622C>T führte zum Austausch der Aminosäure Prolin durch das ebenfalls unpolare und hydrophobe Leucin (Pro541Leu). Die neue Variation (c.1540C>T) trat nur bei Patient NC-6 heterozygot auf. Dies konnte bei wiederholter Amplifikation und Sequenzierung mit dem Reverse-Primer bestätigt werden. Es handelt sich hier um einen Nukleotidaustausch in Kodon 514 von C zu T (Abb.19). Dieser Basenaustausch führt zu einem Aminosäureaustausch von Prolin zu Serin (Pro514Ser) (Abb.20).

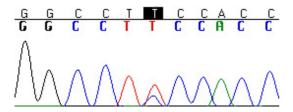


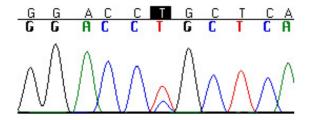
Abbildung 19: Ausschnitt der Sequenz mit der Variation in Exon 14 bei Patient NC-6

Es handelt sich hier um die heterozygote Variation (Pro514Ser). Die betroffene Base ist schwarz markiert.



Abbildung 20: Strukturformeln der Aminosäuren Prolin und Serin und ihre Eigenschaften

Die zweite neue Variation im Exon 14 (c.1622C>T) trat bei Patient NC-42 heterozygot auf. Dies wurde bei wiederholter Amplifikation und Sequenzierung mit dem Reverse-Primer bestätigt. Es handelt sich hier um einen Nukleotidaustausch im Kodon 541 von C zu T (Abb.21). Dieser Basenaustausch führt zu einem Aminosäureaustausch von Prolin zu Leucin (Pro541Leu) (Abb.22).



**Abbildung 21: Ausschnitt der Sequenz mit der Variation in Exon 14 bei Patient NC-42**Es handelt sich hier um die heterozygote Variation (Pro541Leu). Die betroffene Base ist schwarz markiert.



Abbildung 22: Strukturformeln der Aminosäuren Prolin und Leucin und ihre Eigenschaften

In der Genetik und der Biochemie wird unter Konservierung der Erhaltungsgrad eines Gens oder Proteins im Verlauf der Evolution verstanden. Wenn der Genabschnitt zwischen verschiedenen Säugetieren und Wirbellosen nahezu unverändert ist, spricht man von einer "hohen Konservierung". Man rechnet mit einer hohen Bedeutung dieses Genabschnittes. Bei hoher Variation eines Genabschnittes geht man von einer geringeren Bedeutung aus.

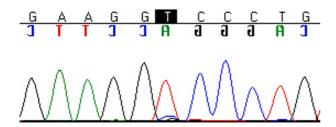
Der Homologievergleich zeigt, dass die Variation im Exon 14 bei der Aminosäuresequenz (Pro514Ser) und (Pro541Leu) sehr hoch konserviert ist (Tab.18).

Tabelle 18: Darstellung der Konservierung des MYOM-2-Genabschnittes mit den Mutationen in Exon 14

| Gattung                     | (Pro514Ser)   | (Pro541Leu)   |
|-----------------------------|---------------|---------------|
| H. sapiens (Mensch)         | QVPGP P TGVHA | PRGKD P LMYFI |
| P. troglodytes (Schimpanse) | QVPGP P TGVHA | PRGKD P LMYFI |
| Macaca mulatta (Rhesusaffe) | QVPGP P TNVHA | PRGKD P LMYFI |
| Mus musculus (Maus)         | QIPGP P TNVQA | PRGKD P LMYFI |
| Rattus norvegicus (Ratte)   | QIPGP P TNVQA | PRGKE P LMYFI |
| Gallus gallus (Huhn)        | QIPGP P TNVHA | PRGRE P LTYFI |
| Danio rerio (Zebrafisch)    | TIPGP P TNVHA | PRGRA P VWYLI |

#### Exon 20

Die Variation c.2504C>T im Exon 20 führte zum Austausch von Alanin zu Valin. Beide Aminosäuren sind unpolar und hydrophob. Die Variation (c.2504C>T) trat ausschließlich bei Patient NC-45 heterozygot auf. Dies konnte bei wiederholter Amplifikation und zusätzlicher Sequenzierung mit Hilfe des Reverse-Primers bestätigt werden. Es handelt sich hier um einen Nukleotidaustausch in Codon 835 von C zu T (Abb.23,Abb.24). Dieser Basenaustausch führt zu einem Aminosäureaustausch von Alanin zu Valin (Ala835Val). Beide Aminosäuren haben ähnliche physikochemische Eigenschaften und unterscheiden sich durch eine Methylgruppe in der funktionellen Gruppe (Abb.25).



**Abbildung 23: Ausschnitt der Sequenz mit der Variation in Exon 20 bei Patient NC-45**Es handelt sich hier um die heterozygote Variation (Ala835Val). Die betroffene Base ist schwarz markiert.

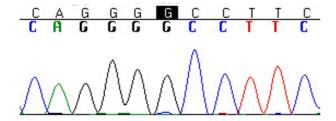


Abbildung 24: Ausschnitt der Wildtypsequenz in Exon 20 bei Patient NC-44

Abbildung 25: Strukturformeln der Aminosäuren Alanin und Valin und ihre Eigenschaften

Der Konservierungsgrad innerhalb des Bereichs um die Ala835Val-Variation im Exon 20 kann, trotz der Abweichung bei den Zebrafischen, als hochkonserviert angesehen werden (Tab.19).

Tabelle 19: Darstellung der Konservierung des MYOM-2-Genabschnittes mit den Mutationen in Exon 20

| Gattung                     | (Ala 835 Val) |
|-----------------------------|---------------|
| H. sapiens (Mensch)         | VMLWK A PVYSG |
| P. troglodytes (Schimpanse) | VMLWK A PVYSG |
| Macaca mulatta (Rhesusaffe) | VMLWK A PVYSG |
| Mus musculus (Maus)         | VILWK A PVYSG |
| Rattus norvegicus (Ratte)   | VILWK A PVYSG |
| Gallus gallus (Huhn)        | VLLWK A PVYEG |
| Danio rerio (Zebrafisch)    | LVQWK P PVYTG |

#### **Exon 25**

Die Variation c.3133G>T im Exon 25 führte zum Austausch des unpolaren und hydrophoben Alanins zum polaren und neutralen Serin. Die Variation in Exon 25 (c.3133G>T) trat nur bei Patient NC-26 heterozygot auf. Diese konnte bei wiederholter Amplifikation und Sequenzierung mit dem Reverse-Primer bestätigt werden. Es handelt sich hier um einen Nukleotidaustausch in Kodon 1045 von Alanin zu Serin (Abb.26, Abb.2, Abb.28).

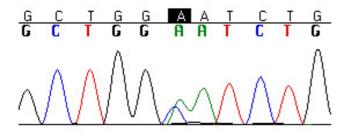


Abbildung 26: Ausschnitt der Sequenz mit der Variation in Exon 25 bei Patient NC-26 Es handelt sich hier um eine Forward-Sequenzierung. Die betroffene Base ist schwarz markiert.

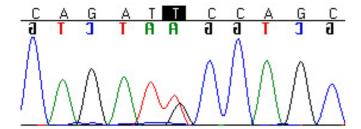


Abbildung 27: Ausschnitt der Sequenz mit der Variation in Exon 25 bei Patient NC-26 zeigt die heterozygote Variation (Ala1045Ser). Es handelt sich hier um eine Reverse-Sequenzierung. Die betroffene Base ist schwarz markiert.

Abbildung 28: Strukturformeln der Aminosäuren Alanin und Serin und ihre Eigenschaften

Der Homologievergleich der Variation im Exon 25 (Ala1045Ser) zeigt eine deutliche Konservierung in der Klasse der Säugetiere (Tab.20).

Tabelle 20: Darstellung der Konservierung des MYOM-2-Genabschnittes mit den Mutationen in Exon 25

| Gattung                     | (Ala 1045 Ser) |
|-----------------------------|----------------|
| H. sapiens (Mensch)         | HLSPD A SYRFI  |
| P. troglodytes (Schimpanse) | HLSPD A SYRFI  |
| Macaca mulatta (Rhesusaffe) | HLSPD A SYRFI  |
| Mus musculus (Maus)         | HLSPD A SFRFI  |
| Rattus norvegicus (Ratte)   | HLSPD A NFRFI  |
| Gallus gallus (Huhn)        | SLSPN S TYRFV  |
| Danio rerio (Zebrafisch)    | KLSSS V NYRFI  |

#### **Exon 26**

Die Variation in Exon 26 (c.3320G>C) trat nur bei Patient NC-47 heterozygot auf. Dies konnte bei wiederholter Amplifikation und Sequenzierung mit dem Reverse-Primer bestätigt

werden. Es handelt sich hier um einen Nukleotidaustausch im Kodon 1107 von G zu C (Abb.29). Dieser Basenaustausch führt zu einem Aminosäureaustausch von Glycin zu Alanin (Gly 1107Ala) (Abb.30).

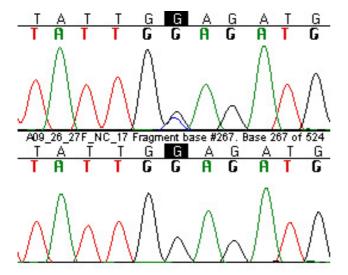


Abbildung 29: Ausschnitt der Sequenz mit der Variation in Exon 26 bei Patient NC-47.

Beim oberen Sequenzabschnitt handelt es sich um die Variation Gly1107Ala und beim unteren Sequenzabschnitt um den Wildtyp. Die betroffene Base ist schwarz markiert.

$$H_2N$$
OH

 $OH$ 
 $OH$ 

Abbildung 30: Strukturformeln der Aminosäuren Glycin und Alanin und ihre Eigenschaften

Die Variation Gly1107Ala in Exon 26 ist in allen Tierklassen hochkonserviert (Tab.21).

Tabelle 21: Darstellung der Konservierung des MYOM-2-Genabschnittes mit den Mutationen in Exon 26

| Gattung                     | (Gly 1107 Ala) |
|-----------------------------|----------------|
| H. sapiens (Mensch)         | SSLVLI G DAFK  |
| P. troglodytes (Schimpanse) | SSLVLI G DAFK  |
| Macaca mulatta (Rhesusaffe) | SSLVLI G DAFR  |
| Mus musculus (Maus)         | SSLVLI G DAFK  |
| Rattus norvegicus (Ratte)   | SSLVLI G DAFR  |
| Gallus gallus (Huhn)        | SSLVLI G DAFK  |
| Danio rerio (Zebrafisch)    | SSLVLV G DAFK  |

Eine Übersicht der fünf gefundenen neuen nicht-synonymen Variationen ist in Abbildung 31 schematisch den einzelnen Exons des MYOM-2-Gens zugeordnet.

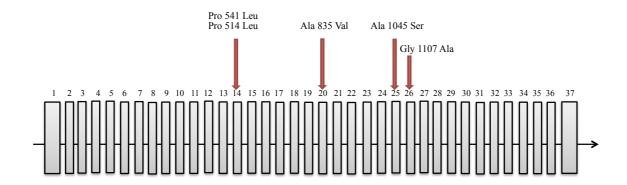


Abbildung 31: Schematische Darstellung des MYOM-2-Gens und der neu gefundenen Variationen. Exons, bei denen eine neue Variation gefunden wurde, sind mit einem roten Pfeil gekennzeichnet.

### 4.4 Ergebnisse der Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus-Analyse

Als zusätzliche Methode zum Nachweis von bestimmten Variationen eignet sich die RFLP-Analyse. Bei Variationen, die eine Restriktionsschnittstelle verändern, findet diese Technik Anwendung. Dies war der Fall für das Exon 25 mit den Restriktionsenzymen TfiI und HinfI. Verdaut man Wildtyp-DNA des Exon 25 mit HinfI werden 3 Fragmente erwartet, die jeweils 207 bp, 215 bp und 118 bp groß sind, wohingegen bei einem Verdau mit TfiI zwei Fragmente erwartet werden (207 bp, 333 bp). Die neu entdeckte Mutation (c.3133G>T) des Patienten NC-26 führt nun dazu, dass für beide genannten Enzyme eine zusätzliche Schnittstelle entsteht, die zu einem veränderten Schnittmuster führt. Die neue HinfI-Schnittstelle liegt im 215 bp-Fragment wodurch zwei neue Fragmente entstehen, die 128 bp und 87 bp groß sind. Die neu entstandene TfiI-Schnittstelle dagegen liegt im 333 bp-Fragment und generiert zwei neue 205 bp und 128 bp große Fragmente (Tab.22).

Tabelle 22 A und B: Erwartetes und tatsächliches Schnittmuster mutierter und Wildtyp-DNA [bp]

| A)         |          |            |              |  |
|------------|----------|------------|--------------|--|
| TfiI       |          |            |              |  |
| Wildtyp    |          | Mutation   |              |  |
| Vorhersage | Ergebnis | Vorhersage | Ergebnis     |  |
| 333        | 325      | 207        | 325          |  |
| 207        | 165      | 205        | 185          |  |
|            |          | 128        | 165 oder 128 |  |

B)

| HinfI      |          |            |          |  |
|------------|----------|------------|----------|--|
| Wildtyp    |          | Mutation   | Mutation |  |
| Vorhersage | Ergebnis | Vorhersage | Ergebnis |  |
| 215        | 207      | 207        | 320      |  |
| 207        | 160      | 128        | 190      |  |
| 118        | 95       | 118        | 165      |  |
|            |          | 87         | 135      |  |

Tatsächlich wich jedoch bereits das Bandenmuster des Wildtyps von den Erwartungen ab. Nichtsdestotrotz, verändert sich das Bandenmuster deutlich, wenn die mutierte DNA mit den jeweiligen Enzymen verdaut wird. Dies deutet auf unterschiedliche Nukleotidsequenzen zwischen beiden DNA-Typen hin.

## 4.5 Ergebnisse des Kontrollkollektivs

Um heraus zu finden, ob es sich bei den neuen nicht-synonymen Variationen um Mutationen handelt, wurde im Kontrollkollektiv (Abschnitt 3.8.1) nach denselben Variationen in den Exons 14, 20, 25 und 26 gesucht.

Die DNA-Proben wurden für das jeweilige Exon mittels PCR amplifiziert, enzymatisch gereinigt, mit einem Forward-Primer sequenziert und mit dem Programm Sequencher 4.10.1 ausgewertet. Das Ergebnis ist der Tabelle 23 zu entnehmen.

Bei der Auswertung der Sequenzierungen der Exons 20 und 25 konnten die gesuchten Singlenucleotide-Polymorphismen (SNPs) in keiner der Kontrollen gefunden werden. Im Exon 14
konnte das SNP c.1540 C>T nicht und das SNP c.1622 C>T nur in einer der Kontrollen
nachgewiesen werden. Der im Exon 26 neu entdeckte SNP konnte ebenfalls in einer der
Kontrollen nachgewiesen werden. In den Fällen in denen ein SNP innerhalb des
Kontrollkollektives nachgewiesen werden konnte, lag die Häufigkeit bei 0,2% bzw. 0,3%
aller Kontrollen.

Tabelle 23: Nachweis der Variationen im Kontrollkollektiv

| Exon | C DNA Position | Anzahl der<br>Kontrollen/gefundene SNP | %   |
|------|----------------|----------------------------------------|-----|
| 14   | c.1540 C>T     | 498 / 0                                | 0   |
| 14   | c.1622 C>T     | 498 / 1                                | 0,2 |
| 20   | c.2504 C>T     | 263 / 0                                | 0   |
| 25   | c.3133 G>T     | 273 / 0                                | 0   |
| 26   | c.3320 G>C     | 364 / 1                                | 0,3 |

# 4.6 Zusammenfassung der Ergebnisse

Tabelle 24: Auflistung aller Ergebnisse der genetischen Analyse dieser Arbeit

| Neu oder<br>Bekannt | Exon | Position in c.DNA | Aminosäure-<br>austausch | des seltenerer<br>Patie | Häufigkeit (%) n Allels in NC- enten |
|---------------------|------|-------------------|--------------------------|-------------------------|--------------------------------------|
| rs35578989          | 2    | c.98C>A           | Ala33Glu                 | 3                       | 5,8%                                 |
| neu                 | 2    | c.99 G>C          | Ala33Ala                 | 1                       | 1,9%                                 |
| rs35985218          | 3    | c.241G>A          | Glu81Lys                 | 2                       | 3,8%                                 |
| rs35022521          | 3    | c.260G>T          | Ser87Ile                 | 1                       | 1,9%                                 |
| rs17064618          | 5    | c.545C>T          | Thr182Met                | 4                       | 7,7%                                 |
| rs34316994          | 10   | c.1087G>A         | Ile363Val                | 6                       | 11,5%                                |
| neu                 | 14   | c.1540 C>t        | Pro514Ser                | 1                       | 1.9%                                 |
| neu                 | 14   | c.1622 C>T        | Pro541Leu                | 1                       | 1,9%                                 |
| rs2294061           | 15   | c.1647G>C         | Ser549Ser                | 6                       | 11,5%                                |
| rs2294062           | 15   | c.1689G>A         | Thr563Thr                | 6                       | 11,5%                                |
| rs17064685          | 16   | c.1836T>G         | Pro612Pro                | 3                       | 5,3%                                 |
| rs2235122           | 16   | c.1953C>T         | Ala651Ala                | 8                       | 15,4%                                |
| rs61732775          | 16   | c.1993G>A         | Gly665Ala                | 1                       | 1,9%                                 |
| rs35335787          | 17   | c.2101G>A         | Val701Ile                | 4                       | 7,7%                                 |
| rs79925336          | 18   | c.2170G>A         | Gly724Ser                | 1                       | 1,9%                                 |
| neu                 | 19   | c.2358G>T         | Ala786Ala                | 1                       | 1,9%                                 |
| neu                 | 20   | c.2504 C>T        | Ala835Val                | 1                       | 1,9%                                 |
| rs4876227           | 20   | c.2586A>C         | Val862Val                | 1                       | 1,9%                                 |
| rs968381            | 20   | c.2606 A>G        | Asn869Ser                | 16                      | 30,8%                                |
| rs2294071           | 21   | c.2682C>T         | Gly894Gly                | 7                       | 13,5%                                |
| rs17684416          | 22   | c.2769A>G         | Gln923Gln                | 6                       | 11,5%                                |
| rs3817705           | 22   | c.2874C>T         | Ile958Ile                | 19                      | 36,5%                                |
| rs75318724          | 24   | c.1568 G>A        | Ser523Asn                | 1                       | 1,9%                                 |
| neu                 | 25   | c.3133 G>T        | Ala1045Ser               | 1                       | 1,9%                                 |
| rs2280897           | 25   | c.3156C>T         | Asp1052Asp               | 8                       | 15,4%                                |
| neu                 | 26   | c.3320 G>C        | Gly1107Ala               | 1                       | 1,9%                                 |
| rs17854780          | 29   | c.3503T>C         | Val1168Ala               | 8                       | 15,4%                                |
| rs35321833          | 36   | c.4056C>T         | Asp1352Asp               | 1                       | 1,9%                                 |

### 5.1 Überblick

Das Herz hält das Kreislaufsystem mit ständigen kontraktilen Bewegungsabläufen durch das gesamte Leben eines Individuums hindurch aufrecht. Die korrekte Funktion der Herzmuskulatur und aller für die Pumptätigkeit notwendigen Strukturen ist essentiell. Krankheiten innerhalb dieses Systems sind entweder nicht mit dem Leben vereinbar oder beeinträchtigen sowohl die Lebensqualität als auch die Lebensdauer.

Kardiomyopathien sind eine heterogene Gruppe von Krankheiten des Herzmuskels, die mit mechanischen und/oder elektrischen Funktionsstörungen einhergehen und oft eine Hypertrophie (HCM) oder Dilatation (DCM) der Herzkammern verursachen. Die Ursachen sind vielfältig und häufig genetisch bedingt (Maron *et al.* 2006). Es ist bekannt, dass Mutationen in Sarkomer-Proteinen verschiedene Kardiomyopathien verursachen können, die unterschiedliche Phänotypen wie HCM, DCM oder LVNC aufweisen (E. Oechslin *et al.* 2011).

Das Sarkomer ist die kleinste funktionelle und kontraktile Einheit der Herzmuskelzellen. Es wird durch die Z-Scheiben eingegrenzt, an die sowohl die Titin- als auch die Aktin-Moleküle befestigt sind. Weitere Bestandteile sind die dicken Myosin-Filamente und die M-Bande. Die M-Bande, die wiederum zu den transversalen Strukturen des Sarkomers gehört, hat Myomesin 1 als zentralen Bestandteil (Luther *et al.*, 1981). Die Funktion der M-Bande ist während der Kontraktions- und Relaxationsphase zur Stabilität des Sarkomers beizutragen und Deformationen vorzubeugen (Millman *et al.*, 1998; Agarkova *et al.*, 2003).

In der M-Bande des Herzmuskels treffen die Proteine der Myomesin-Gen-Familie (Myomesin 1 und 2) und die C-terminalen Abschnitte des Titin-Moleküls zusammen. Zusätzlich sind hier die Verknüpfungspunkte der Myomesin-Moleküle untereinander enthalten, sowie die der Myomesin-Moleküle mit den Myosin-Proteinen in den dicken Filamenten (Abb.2). Die Wechselwirkungen zwischen Myomesin 2, Myomesin 1 und dem C-Terminus des Titins innerhalb der M-Bande werden über die zentralen FN-Domäne des Myomesin 2 vermittelt. Des Weiteren ist es erneut Myomesin 2, das über seine Ig-ähnlichen Domänen die Verbindung der M-Bande zu den dicken Myosin-Filamenten herstellt (Abb.6) (Obermann *et al.*, 1997).

Im Verlauf der Myofibrillogenese ordnen sich die dicken Filamente und die Titin-Filamente in eine hexagonale Gitterstruktur; dabei spielt die M-Bande eine bedeutende Rolle (Wang *et al* 1998, Ehler *et al* 1999). Myomesin hat eine ähnliche Struktur wie Titin. Es besteht aus Ig-

ähnlichen und FN-III-Domänen. Mutationen im Titin können HCM und DCM verursachen. Myomesin und Titin sind beide wichtig für die Elastizität des Sarkomers (Schoenauer *et al.*, 2005).

Kürzlich wurde festgestellt, dass Veränderungen der biophysikalischen und biochemischen Eigenschaften des Myomesin 1-Proteins zur Entstehung von HCM beitragen könnten (Siegert *et al.*, 2011). Üblicherweise bildet Myomesin 1 über eine Bindestelle in dessen C-terminalen Domäne 13 antiparallele Homodimere (Abb.7) (Lange *et al.*, 2005). Die stabile Ausbildung dieser Homodimere ist essentiell für die Sarkomer- und damit für die Herzmuskelfunktionen. Genetische Untersuchungen einer Familie mit hereditärer HCM führte zur Entdeckung einer Mutation in der Domäne 12 (V1490I), die zu einer erschwerten Homodimerbildung über die Domäne 13 führt. Biophysikalisch ist diese Mutation durch eine verringerte Thermostabilität und biochemisch durch eine erhöhte Dissoziationskonstante (KD<sub>wt</sub>: 0,74 μM vs. KD<sub>mut</sub>: 2,5 μM) gekennzeichnet. Da die Dimerbildung die strukturelle Grundlage für die Funktion des Myomesin 1 innerhalb des Sarkomers darstellt, könnte die Störung dieser Interaktion das Krankheitsbild der untersuchten HCM-Patienten erklären (Siegert *et al.*, 2011).

HCM, eine sehr gut erforschte Kardiomyopathie, wird hauptsächlich durch Mutationen in Sarkomer-Proteinen verursacht und wurde früher als "Sarkomer-Krankheit" bezeichnet. Bis heute wurden mehr als 400 Mutationen in 13 Genen als Ursache für HCM identifiziert (Mogensen *et al.*, 2004; Maron *et al.*, 2006). Eine der am häufigsten auftretenden Mutationen bei HCM-Patienten ist eine Mutation im MyH7-Gen, das für eine Isoform des myosin heavy chain beta (MHC-β) kodiert (Seidman *et al* 2001; Marian *et al.*, 2001). Mutationen in MHC-β treten jedoch auch gehäuft bei LVNC-Patienten auf (Klaassen *et al.*, 2008). Das MHC-β-Protein ist Hauptbestandteil der dicken Filamente, deren korrekte Positionierung durch die M-Bande gewährleistet wird (Luther *et al.*, 1981).

Letztendlich hängt die Funktion des Sarkomers vom reibungslosen Zusammenspiel einer Reihe von Proteinen ab. Die übergeordnete Aufgabe der Sarkomere im Herzmuskel ist es koordiniert zu kontrahieren und in die Ausgangslage zurückzukehren. Sind einzelne Bestandteile des Sarkomers "beschädigt" kann genannter Ablauf gestört sein. Dabei kann die Fehlfunktion verschiedener Bauteile (i.e. Proteine) zu derselben Krankheit führen bzw. unterschiedliche krankhafte Phänotypen können durch die Fehlfunktion ein und desselben "Bauteils" verursacht sein. So können zum Beispiel Mutationen in den Genen TNNT2, ACTC und MYH7 sowohl LVNC als auch HCM verursachen.

Aus diesen Gründen und angesichts der strukturellen und funktionellen Homologie zwischen den Proteinen der Myomesin-Genfamilie liegt es nahe, deren andere Vertreter auf pathologisch relevante Mutationen hin zu untersuchen. Zu diesem Zweck wurde in dieser Arbeit die Nukleotidsequenz des Myomesin 2-Gens per PCR auf Mutationen untersucht. Dabei wurden fünf unbekannte und nicht-synonyme Variationen in den Exons 14, 20, 25 und 26 gefunden (Tab.17), sowie zwei unbekannte synonyme Variationen in den Exons 2 und 19 (Tab.16). Zahlreiche bekannte synonyme und nicht-synonyme Variationen wurden bestätigt (Tab.14 und 15).

### 5.2 Methoden-Diskussion

Mit Hilfe hochspezifischer und sensitiver Standard-Methoden (PCR, direkter Sequenzierung) wurden alle Exons des Gens MYOM2 der 52 LVNC-Patienten erfolgreich ausgewertet. Schwierigkeiten traten lediglich bei der Amplifikation des Exon 14 auf. Durch Umstellung der PCR auf "nested" Primer, deren Bindungssequenzen weiter innen in der Zielsequenz liegen, konnten die Schwierigkeiten behoben werden. Das Ergebnis der PCR-Reaktionen waren eindeutige Banden, die gelelektrophoretisch sichtbar gemacht wurden. Durch Forward-und/oder Reverse-Sequenzierungen der PCR-Produkte konnte ein deutliches Bild der Abfolge der Nukleotide gewonnen werden. Die sequentielle Abfolge von PCR, Gelelektrophorese und Sequenzierung gewährleistet eine sichere und verlässliche Auswertung der Ergebnisse.

Zur Bestätigung der Ergebnisse mit weiteren Methoden wurde am Beispiel des Exon 25 eine RFLP-Analyse durchgeführt. Grundlage dieser Methode ist, dass eine Neuentstehung bzw. das Verschwinden einer Restriktionsschnittstelle durch eine Mutation in der zu analysierenden Nukleotidsequenz hervorgerufen wird. Dies führt bei einem enzymatischen Verdau mit Hilfe identischer Restriktionsendonukleasen zu Unterschieden im Bandenmuster zwischen der Wildtyp- und der mutierten Sequenz.

Diese Methode ergab sich jedoch als weniger sensitiv und war im vorliegenden Fall gering aussagekräftig. Die RFLP-Analyse beschränkte sich auf das Exon 25, da nur hier die Veränderungen in der Sequenz auch zu einer Veränderung im Restriktionsmuster führten. Für alle weiteren gefundenen Sequenzveränderungen war dies nicht der Fall.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die eingesetzten Methoden zur Bearbeitung der Problemstellung geeignet waren.

## 5.3 Diskussion der erzielten Ergebnisse

#### 5.3.1 Bekannte synonyme und nicht-synonyme Variationen

Bei der genetischen Analyse konnten zehn bekannte synonyme Variationen bestätigt werden. Die Variationen traten mit stark variierenden Häufigkeiten auf (1,9 - 36%). Des Weiteren wurden elf bekannte nicht-synonyme Variationen bestätigt. Die Daten sind der Tab. 15 in Abschnitt 4.3.1.2 zu entnehmen.

Der Aminosäureaustausch Asn869Ser im Exon 20 trat mit 31% am häufigsten innerhalb des untersuchten Patientenpools auf. Dieses Ergebnis korreliert stark mit der Häufigkeit der Variation innerhalb der europäischen Population (33%). Weltweit liegt die Häufigkeit bei 42% (http://www.ensembl.org). Der Aminosäureaustausch Val168Ala im Exon 29 wurde in 15,4% der untersuchten Proben festgestellt. Die Ensemble-Datenbank listet in diesem Fall die Häufigkeit innerhalb der europäischen Population mit 14% und weltweit mit 13% auf. Der Aminosäureaustausch Gly665Ala im Exon 16 kommt weltweit äußerst selten vor. Lediglich innerhalb der afrikanischen Population wird eine signifikante Häufigkeit von 2% erreicht. In dieser Studie wurde die Variation ebenfalls bei 2% der Patienten gefunden.

Die Häufigkeit mit der die Asn869Ser- und Vall168Ala-Variationen entdeckt wurden, spiegelt die entsprechende Häufigkeit innerhalb der europäischen Population wider. Wohingegen die Gly665Ala-Variation in ihrer Häufigkeit eher die afrikanische Population nachahmt. Letztendlich werden die festgestellten Frequenzen weitestgehend von der Ensemble-Datenbank unterstützt.

#### 5.3.2 Unbekannte synonyme Variationen

Die in dieser Arbeit entdeckten Variationen c.99G>C im Exon 2 und c.2358G>C im Exon 19 sind in der Literatur und in den Datenbanken noch nicht beschrieben. Diese führen jedoch nicht zu einer Veränderung der Aminosäuresequenz, womit eine Veränderung des Myomesin-Proteins ausgeschlossen wird. Diese Variationen wurden jeweils bei einem Probanden nachgewiesen.

Es sind für die Position c.99 des Exons 2 zwei weitere Variationen beschrieben. Zum einen handelt es sich dabei um eine nicht-synonyme (c.99C>A) und zum anderen um eine synonyme (c.99G>A) Variation. Durch die Entdeckung einer dritten Variation innerhalb desselben Codons könnte vermutet werden, dass die DNA in dieser Position anfällig für Mutationen ist.

#### 5.3.3 Unbekannte nicht-synonyme Variationen

Die Besprechung der unbekannten nicht-synonymen Variationen wird im Folgenden in zwei Abschnitte gegliedert.

#### Variationen innerhalb der Fibronektin-Typ-III-Domänen

Im Exon 14 wurden zwei neue Mutationen gefunden. Beide ursprünglichen Triplets kodieren für Prolin und in beiden Fällen führt die Mutation zu einem Austausch dieser Aminosäure. Weitere Gemeinsamkeiten sind die Transition eines Cytosins zum Thymin und die Lokalisation innerhalb der FNIII-Domäne des Myomesin 2-Proteins. Diese Domäne ist gekennzeichnet durch eine hohe Anzahl an Prolin-Seitenketten, die Funktionen im Faltungsprozess der Domäne übernehmen (Plaxco *et al.*, 1996). Prolin wird auch als "Helixbrecher" bezeichnet. Es ist meist an Übergängen einer Alpha-Helix zu anderen Sekundärstrukturen beteiligt. Ein Austausch von oder zu Prolin kann demnach häufig zu Veränderungen in der Faltung, und in Folge dessen zu funktionellen Aberrationen eines gegebenen Proteins führen. Ist die Faltung dieser Domäne gestört, kann das die Funktionalität des gesamten Proteins negativ beeinflussen. Zudem befinden sich beide Mutationen in hochkonservierten Bereichen der Domäne. Meist sind diese Bereiche von großer Wichtigkeit für die Funktionalität und wurden daher evolutiv erhalten. Mutationen in hoch-konservierten Bereichen sind oft Grundlage genetischer Erkrankungen.

Die beiden Mutationen im Exon 14 traten bei jeweils einem Patienten auf. Die Pro514Ser-Mutation wurde bei Patient NC-6 nachgewiesen und die Pro541Leu-Mutation bei Patient NC-42. Patient NC-6 wies zudem vier weitere bekannte Mutationen auf. Diese befanden sich zweimal im Exon 16 (Gly665Ala und Pro612Pro), einmal im Exon 20 (Asn869Ser) und im Exon 36 (Asp1352Asp). Der Patient NC-42 wies eine weitere synonyme Variation im Exon 22 auf (Ile958Ile), die bei 19 weiteren NC-Patienten ebenfalls vorkam.

Den oben erwähnten Erkenntnissen folgend könnten beide neu entdeckten Variationen als neue Mutationen bezeichnet werden, die wahrscheinlich kausal mit dem Krankheitsbild des Patienten zusammen hängen.

Im Exon 20 wurde bei Patient NC-45 eine Cytosin-Thymin-Transition (c.2504C>T) gefunden, die zum Austausch der Aminosäure Alanin mit Valin führt (Ala835Val). Die funktionellen Gruppen beider Aminosäuren unterscheiden sich lediglich in der Anzahl an Methylgruppen, wodurch sie ähnliche physikochemische Eigenschaften aufweisen. Beide Aminosäuren sind unpolar und hydrophob, das Valin besitzt jedoch eine, um ein

Kohlenstoffatom längere Seitenkette, was je nach topographischer Lage zu sterischen Behinderungen im Gesamtmolekül führen kann. Auch in diesem Fall liegt die Mutation innerhalb der FNIII-Domäne des Myomesin 2-Proteins und ist in einer hoch-konservierten Region lokalisiert.

Der Patient NC-45 weist zudem drei weitere Variationen auf. Diese befinden sich im Exon 5 (Thr182Met), im Exon 20 (Val862Val) und im Exon 22 (Ile958Ile). Jede dieser Mutationen findet sich mit unterschiedlicher Häufigkeit bei anderen Patienten wieder.

Durch weitergehende Versuche müsste geklärt werden, ob die in diesem Abschnitt beschriebenen unbekannten Variationen tatsächlich die strukturelle Integrität der M-Bande beeinflussen und dadurch zum Krankheitsbild einer LVNC beitragen könnten. Ihre Lage innerhalb der hoch-konservierten FNIII-Domäne und der maßgeblichen Beteiligung dieser Domänen an den Interaktionen der M-Banden-Proteine untereinander macht die neu entdeckten Variationen zu interessanten Untersuchungsobjekten für zukünftige Versuchsvorhaben.

#### Variationen innerhalb der Immunoglobulin-ähnlichen Domänen

Eine weitere, bislang unbekannte Mutation, wurde im Exon 25 des Patienten NC-26 gefunden. Die Transversion c.3133G>T führt zum Austausch des unpolaren und hydrophoben Alanins mit dem polaren und neutralen Serin (Ala1045Ser). Alanin tritt gehäuft in alpha-Helices auf und begünstigt durch seine Eigenschaften die Bildung derartiger Sekundärstrukturen. Daher wird Alanin auch als Helixbildner bezeichnet (Stryer *et al.*, 2003). Die Ala1045Ser-Mutation befindet sich in der Ig-Domäne des Myomesin 2-Proteins, die für den exakten Einbau des Myomesins in die M-Bande während der Myofibrillogenese wichtig ist. Zudem liegt auch diese Mutation in einem hoch-konservierten Bereich. Daher ist es denkbar, dass auch diese Mutation Einfluss auf die Funktionalität der Herzmuskulatur hat. Der Patient NC-26 weist keine weiteren bekannten Variationen auf.

Im Exon 26 des Patienten NC-47 wurde eine unbekannte Mutation gefunden. Die hier aufgetretene Transversion c.3320G>C führte zum Austausch der polaren und hydrophilen Aminosäure Glycin zum unpolaren und hydrophoben Alanin (Gly1107Ala). Das Exon 26 befindet sich ebenfalls in der Ig-Domäne. Zusätzlich weist Patient NC-47 fünf weitere, bereits bekannte, Variationen auf (Ala33Glu, Val1168Ala, Ser549Ser, Thr563Thr, Asp1052Asp).

Ähnlich wie im Falle der unbekannten Variationen innerhalb der FNIII-Domäne, müsste auch in diesem Fall ein möglicher Zusammenhang zwischen den in diesem Abschnitt

beschriebenen neu entdeckten Variationen und dem Krankheitsbild einer LVNC erst empirisch nachgewiesen werden. Jedoch sind beide neuen Variationen erneut in einer hochkonservierten und für Protein-Protein-Interaktionen unerlässlichen Domäne lokalisiert, die für die Stabilität des Sarkomers, vor allem während der Kontraktionsphase, besonders wichtig ist. Zudem spielt diese Domäne während der Myofibrillogenese eine bedeutende Rolle und könnte daher für eine spätere LVNC prädisponierend sein.

Bei den neu entdeckten Variationen könnte es sich um seltene krankheitsverursachende Mutationen handeln, da deren Häufigkeit innerhalb des Kontrollkollektives stets unter 1% lag (s. Tab.18). Zudem liegen sie in Bereichen, die funktionell wichtige Domänen bilden und während der Evolution hoch-konserviert sind. Alle liegen als heterozygote Missense-Mutationen vor, ebenso wie die in der Literatur bereits beschriebenen Mutationen für LVNC. Anomalien in strukturellen Proteinen sind meist dominant. Im Gegensatz zu Anomalien in z.B. Enzymen, deren Funktion durch das "gesunde" Allel kompensiert werden kann, kann bei strukturellen Proteinen das "gesunde" Allel den Einbau fehlerhafter Proteine nicht kompensieren. Die gefundenen Variationen könnten daher durchaus mit dem Krankheitsbild LVNC in Verbindung stehen.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass eine Reihe von verschiedenen Variationen im MYOM-2 identifiziert wurden. Durch molekulargenetische Analysen konnten fünf bisher nicht beschriebene Variationen identifiziert werden. Die Genauigkeit der erzielten Ergebnisse wurde durch Vergleiche gefundener bekannter Variationen mit der Ensembl-Datenbank bestätigt. Letztendlich bleiben Aussagen über Mechanismen rein spekulativ, da zur Zeit keine knock-out-Mausmodelle der Myomesin-Gen-Familie verfügbar sind. Pathophysiologisch würde ein Zusammenhang zwischen LVNC und Myomesin 2-Variationen sehr gut in das Krankheitsmodell der Kardiomyopathien passen, da bereits für diverse andere Sarkomer-Proteine ein solcher Zusammenhang hergestellt werden konnte.

#### 5.4 Ausblick

Wie bereits in der Diskussion der Ergebnisse spekuliert wurde, wäre es möglich, dass die neu entdeckten Variationen innerhalb hoch-konservierter Domänen des Myomesin 2-Proteins ursächlich mit dem krankhaften Phänotyp der LVNC-Patienten verbunden sind. Diese Kausalität eindeutig nachzuweisen ist die Aufgabe zukünftiger Projekte.

Zu diesem Zweck wäre es in einem ersten Schritt denkbar, Familien, in denen LVNC gehäuft auftritt, genetisch auf Mutationen zu untersuchen. Anschließend könnten die mutierten Proteinsegmente molekulargenetisch auf ihre biophysikalischen (Thermostabilität) und biochemischen (Assoziation und Dissoziation) Eigenschaften hin untersucht werden. Sollten hier Abweichungen zu den Wildtyp-Formen der entsprechenden Segmente gefunden werden, wäre das bereits ein deutliches Indiz für einen pathophysiologischen Zusammenhang zwischen den Mutationen und dem Krankheitsbild.

Darüber hinaus könnten auch strukturelle Analysen des Myomesin 2-Proteins und seiner Variationen durchgeführt werden, um eventuelle Fehlfaltungen zu detektieren.

Besteht tatsächlich ein kausaler Zusammenhang zwischen den gefundenen Mutationen und dem Ausbruch der Krankheit würde das eventuelle therapeutische Maßnahmen ermöglichen bzw. diese Mutationen könnten als Marker für ein erhöhtes Krankheitsrisiko dienen.

### Literaturverzeichnis

- 1. Agarkova I, Auerbach D, Ehler E *et al.*, A novel marker for vertebrate embryonic heart, the EH-myomesin isoform. J Biol Chem. 2000; 275:10256-10264.
- 2. Agarkova I, Ehler E, Lange S, *et al.* M-band: a safeguard for sarcomere stability? Journal of Muscle Research and Cell Motility 2003; 24: 191-203.
- 3. Agarkova I and Perriard J., The M-band: an elastic web that crosslinks thick filaments in the center of the sarcomere. Trends Cell Biol 2005; 15: 477-485.
- 4. Agarvoka I, Schoenauer R, Ehler E. *et al.*, the molecular composition of the sarcomeric M-band correlates with muscle fiber Typ. Eur. J. Cell Biology 2004; 83:193-204.
- 5. Aman S, McKenna W *et al.*, Molecular genetics of familiar cardiomyopathies. Advances in Genetics 1997; 35: 285-323.
- 6. Andrews R, Fenton M, Ridout D *et al.*, British Congenital Cardiac Association. New-onset heart failure due to heart muscle disease in childhood: a prospective study in the United Kingdom and Ireland. Circulation 2008; 117: 79-84.
- 7. Auerbach D, Bantle S, Keller S *et al.*: different domains of the M-band protein myomesin are involved in myosin Binding and M-band targeting. Mol Biol Cell 1999; 10: 1297-1308.
- 8. Australian Genetic Heart Disease Registry, Information Sheet, 2012
- 9. Bernanke D, Velkey J *et al.*, Development of the coronary blood supply: changing concepts and current ideas. Anat Rec 2002; 269: 198–208.
- 10. Chin T, Perloff J, Williams R *et al.*, Isolated noncompaction of left ventricular myocardium. A study of eight cases. Circulation 1990; 82:507–513.
- 11. Conraads V, Paelinck B, Vorlat A *et al.*, Isolated non-compaction of the left ventricle: a rare indication for transplantation. J Heart Lung Transplant 2001; 20: 904-907.
- 12. Deutsches Ärzteblatt Int 2010; 107(12): 206-13.
- 13. Ehler E, Rothen B, Hammerle S *et al.*, Myofibrillogenesis in the developing chicken heart: assembly of Z-disk, M-line and the thick filaments. J Cell Sci. 1999; 112: 1529-1539
- 14. Eppenberger H, Perriard J, Rosenberg E *et al.*, The Mr 165,000 M-protein myomesin: a specific protein of cross-striated muscle cells. J Cell. Biol.1981; 89: 185-193.
- 15. Engberding R, Yelbuz M, Breithardt G *et al.*, Isolated noncompaction of the left ventricular myocardium. A review of the literature two decades after the initial case description. Clin Res Cardiol 2007; 96: 481-8.
- 16. Engberding R, Bender F *et al.*, Identification of a rare congenital anomaly of the myocardium by two-dimensional echocardiography: persistence of isolated myocardial sinusoids. J Cardiol 1984; 53:1733-1734.
- 17. Freedom R, Yoo S, Perrin D *et al.*, The morphological spectrum of ventricular noncompaction. Cardiol Young 2005; 15: 345-364.
- 18. Fukuzawa A *et al.*, Interactions with titin and Myomesin target obscurin and obscurin-like 1 to the M-Band-implications for hereditary myopathies. Journal of Cell Science 2008; 121: 1841-1951.
- 19. Grant R, An unusual anomaly of the coronary vessels in the malformed heart of a child. Heart 13 1926; 261-271
- 20. Grove B, Kurer V, Lehner C *et al.*, A new 185,000-dalton skeletal muscle protein detected by monoclonal antibodies. J Cell Biol 1984; 98: 518-24.
- 21. Grove B, Cerny L, Perriard J *et al.*, Fiber type-specific distribution of M-band proteins in chicken muscle. J Histochem Cytochem 1989; 37: 447-454.
- 22. Hoedemaekers Y, Caliskan K, Majoor-Krakauer D et al., Cardiac beta-myosin heavy chain defects in two families with non-compaction cardiomyopathy: linking

- noncompaction to hypertrophic, restrictive, and dilated cardiomyopathies. Eur Heart J 2007; 28:2732-2737.
- 23. Hornemann T, Kempa S, Himmel Met al., Muscle-type creatine kinase interacts with central domains of the M-band proteins Myomesin and M-protein. J Mol Biol 2003; 322: 877-87.
- 24. Ichida F, Tsubata S, Bowles K *et al.*, Novel gene mutations in patients with left ventricular noncompaction or Barth syndrome. Circulation 2001;103:1256-1263.
- 25. Ichida F. Left ventricular noncompaction. Circ J 2009; 73(1): 19-26.
- 26. Jenni R, Wyss C, Oechslin E *et al.*, Isolated ventricular noncompaction is associated with coronary microcirculatory dysfunction. J Am Coll Cardiol 2002; 39: 450-454.
- 27. Kaya Z, Ehlerman P, Universitätsklinikum Heidelberg 2008.
- 28. Kenton A, Sanchez X, Coveler K *et al.*, Isolated left ventricular noncompaction is rarely caused by mutations in G4.5, alpha-dystrobrevin and FK binding protein-12. Mol Genet Metab 2004; 82: 162-166.
- 29. Klaassen S, Probst S, Oechslin E *et al.* Mutations in sarcomere protein genes in left ventricular noncompaction. Circulation 2008;117: 2893-2901.
- 30. Kreuder J, Kardiomyopathien Klinische und pathologisch-pathophysiologische Grundlagen, Monatsschrift Kinderheilkunde 2004; 152:620-631.
- 31. Labeit S and Kolmerer B *et al.*, Titins: giant proteins in charge of muscle ultrastructure and elasticity. Science. 1995; 270: 293-296.
- 32. Lange S, Agarkova I, Perriard J *et al.*, The sarcomeric M-band during development and in disease. Journal of Muscle Research Cell Motiliy 2005; 26: 375-379.
- 33. Lange S, Himmel M, Auerbach D *et al.*, Dimerisation of Myomesin: Implications for the structure of the sarcomeric M-band. J. Mol. Biol. 2005; 345: 289-298.
- 34. Luther P, Munro P, Squire J *et al.*, Three-dimensional structure of the vertebrate muscle A-band. III. M-region structure and myosin filament symmetry. J Mol Biol 1981; 151: 703-730.
- 35. Maisch B, Noutsias M, Ruppert V *et al.*, Cardiomyopathies: Classification, Diagnosis, and Treatment. Heart Failure Clin 8 2012; 53-78
- 36. Marian A, Roberts R, The molecular genetic basis for hypertrophic cardiomyopathy. J Mol Cell Cardiol 2001; 33(4): 655-70.
- 37. Maron B, Towbin J, Thiene G *et al.*, Contemporary definitions and classification of the cardiomyopathies: an American Heart Association Scientific Statement from the Council on Clinical Cardiology, Heart Failure and Transplantation Committee; Quality of Care and Outcomes Research and Functional Genomics and Traslational Biology Interdisciplinary Working Groups; and Council on Epidemiology and Prevention. Circulation 2006: 113: 1807-1816.
- 38. Masaki T, Takaiti O, M-protein. J Biochem. 1974; 75(2): 367-80.
- 39. Millman B, The filament lattice of striated muscle. Physiol. Rev. 1998; 78: 359-391.
- 40. Mogensen J, Murphy R, Kubo T *et al.*, Frequency and clinical expression of cardiac troponin I mutations in 748 consecutive families with hypertrophic cardiomyopathy. J Am Coll Cardiol. 2004; 44(12): 2315-25.
- 41. Monserrat L, Hermida-Prieto M, Fernandez X *et al.*, Mutation in the alpha-cardiac actin gene associated with apical hypertrophic cardiomyopathy, left ventricular non-compaction, and septal defects. Eur Heart J 2007; 28:1953-1961.
- 42. Nugent A, Daubeney P, Chondros P *et al.*, The epidemiology of childhood cardiomyopathy in Australia. N Engl J Med 2003; 348: 1639-1646.
- 43. Obermann W, Gautel M, Weber K *et al.*, Molecular structure of the sarcomeric M- band: mapping of titin and myosin binding domains in myomesin and the identification of a potential regulatory phosphorylation site in myomesin. EMBO J 1997; 16: 211-220

- 44. Oechslin E, Attenhofer Jost C, Rojas J *et al.*, Long-term follow-up of 34 adults with isolated left ventricular noncompaction: a distinct cardiomyopathy with poor prognosis. J Am Coll Cardiol 2000;
- 45. Oechslin E., Jenni R. Left ventricular non-compaction revisited: a distinct phenotype with genetic heterogeneity? European Heart Journal 2011; 32:1446-1456.
- 46. Pignatelli R, McMahon C, Dreyer W *et al.*, Clinical characterization of left ventricular noncompaction in children: a relatively common form of cardiomyopathy. Circulation 2003;108: 2672-2678.
- 47. Plaxco K, Spitzfaden C, Campbell I *et al.*, Rapid refolding of a proline-rich all-beta-sheet fibronectin type III module. Proc Natl Acad Sci U S A 1996; 93(20):10703-6.
- 48. 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. <u>Circulation</u>. 1996 Mar 1;93(5):841-842
- 49. Ritter M, Oechslin E, Sutsch G *et al.*, Isolated noncompaction of the myocardium in adults. Mayo Clin Proc 1997; 72: 26-31.
- 50. Sandhu R, Finkelhor R, Gunawardena D *et al.*, Prevalence and characteristics of left ventricular noncompaction in a community hospital cohort of patients with systolic dysfunction. Echocardiography 2008; 25: 8-12.
- 51. Sasse-Klaassen S, Probst S, Gerull B *et al.*, Novel gene locus for autosomal dominant left ventricular noncompaction maps to chromosome 11p15. Circulation 2004; 109: 2720-2723
- 52. Seidman C, Seidman J, Identifying sarcomere gene mutations in hypertrophic cardiomyopathy: a personal history. Circ Res. 2011; 108 (6): 743-50.
- 53. Sen-Chowdhry S, McKenna W *et al.*, Left ventricular noncompaction and cardiomyopathy: cause, contributor, or epiphenomenon? Curr Opin Cardiol 2008; 23: 171-175.
- 54. Schoenauer R, Bertoncini P, Machaidze G *et al.*, Myomesin is a molecular spring with adaptable elasticity. J Mol Biol. 2005; 349: 367–379.
- 55. Schoenauer R, Lange S, Hirschy A *et al.*, Myomesin 3, a novel structural component of the M-band in striated muscle. J Mol Biol . 2008; 376: 338-351.
- 56. Schoenauer R, Emmert M, Felley A *et al.*, EH-myomesin splice isoform is a novel marker for dilated cardiomyopathy. Basic Res Cardiol. 2011;106(2):233-47.
- 57. Sjöström M, Squire J, Fine structure of the A-band in cryo-sections. The structure of the A-band of human skeletal muscle fibres from ultra-thin cryo-sections negatively stained. J Mol Biol. 1977; 109(1):49-68.
- 58. Siegert R, Perrot A, Keller S *et al.*, A myomesin mutation associated with hypertrophic cardiomyopathy deteriorates dimerisation properties. Biochem Biophys Res Communn 2011; 405(3): 473-9
- 59. Speel E, van der Ven P, Albrechts J *et al.*, Assignment of the Human Gene for the Sarcomeric M-band protein myomesin (MYOM1) to 18p11.31-p11.32. Genomics 1998; 54: 184-186.
- 60. Steiner F, Weber K, Furst D *et al.*, M-band proteins myomesin and skelemin are incoded by the same gene: analysis of ist organisation and expression. Genomics 1999; 56: 78-89.
- 61. Stöllberger C, Winkler-Dworak M, Blazek G *et al.*, Prognosis of left ventricular hypertrabeculation/ concompaction is dependent on cardiac and neuromuscular comorbidity. Int J Cardiol 2007; 121: 189-193.
- 62. Strüber M, Meyer A, Malehsa D *et al.*, The current status of heart transplantation and the development of artificial heart systems. [Situation der Herztransplantation und Weiterentwicklung von Kunstherzen]. Dtsch Ärztebl Int 2009; 106(28–29): 471–7.
- 63. Varnava A. *et al.*, Isolated left ventricular non-compaction: a distinct cardiomyopathy? Heart 2001;86:599-600.

#### Literaturverzeichnis

- 64. Vatta M, Mohapatra B, Jimenez S *et al.*, Mutations in Cypher/ZASP in patients with dilated cardiomyopathy and left ventricular non-compaction. J Am Coll Cardiol 2003; 42: 2014-2027.
- 65. Wang S, Lo M, Kao S *et al.*, Role of M-Line proteins in sarcomeric titin assembly during cardiac myofibrillogenesis. J. Cell. Biochem. 1998; 71: 82-95.
- 66. Weiford B, Subbarao V, Mulhern K *et al.*, Noncompaction of the ventricular myocardium Circulation 2004; 109: 2965-2971.
- 67. Zaragoza M, Arbustini E, Narula J *et al.*, Noncompaction of the left ventricle: primary cardiomyopathy with an elusive genetic etiology. Curr Opin Pediatr 2007;19: 619-627.

#### Bücher

- 68. Voet D, Voet J.G, Pratt C.G, Lehrbuch der Biochemie 2002
- 69. Samandari F, Mai J.K, Curriculum Funktionelle Anatomie für Zahnmediziner, Band I, 1995 (Quintessenz Verlags-GmbH)
- 70. Berg J.M, Tymoczko J.L, Stryer L: Biochemie. 5. Auflage 2003

#### Websites

- 71. AHA ,online: http://circheartfailure.ahajournals.org
- 72. NCBI, online: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/genome/probe/doc/TechPCR.shtml
- 73. Ensembl Genome Browser: http://www.ensembl.org

# Abbildungsverzeichnis

| Abbildung 1: Schematischer Aufbau des Herzens und des daran angeschlossenen            |      |
|----------------------------------------------------------------------------------------|------|
| Gefäßsystems                                                                           | 1    |
| Abbildung 2: Schematische Darstellung des Sarkomers                                    | 2    |
| Abbildung 3: Schematische Darstellung der M-Banden-Komponenten: Myomesin 2 und         |      |
| Myomesin 1                                                                             | 4    |
| Abbildung 4: Molekulare Komposition der M-Bande in verschiedenen Muskeltypen           | 5    |
| Abbildung 5: Proteinstruktur der Myomesin-Protein-Familie                              | 6    |
| Abbildung 6:Anordnung von Myosin, Myomesin 1, Myomesin 2 und Titin in der M-Bande      | e7   |
| Abbildung 7: Drei-dimensionales Modell des Myomesins in der M-Bande                    | 8    |
| Abbildung 8: Schema der AHA-Klassifikation für primäre Kardiomyopathien                | 9    |
| Abbildung 9: Tabellarische Ordnung sekundärer Kardiomyopathien                         | 10   |
| Abbildung 10: Schematische Darstellungen eines gesunden (links) und eines an LVNC      |      |
| erkrankten Herzens (rechts)                                                            | 11   |
| Abbildung 11: Natürlicher Verdichtungsprozess während der Embryonalentwicklung         | 12   |
| Abbildung 12: Genetische Mutationen bei LVNC:                                          | 13   |
| Abbildung 13: Klinische Symptome bei pädiatrischen und erwachsenen Patienten mit       |      |
| LVNC-Kardiomyopathie                                                                   | 14   |
| Abbildung 14: Transsektionale Ansicht der dorsalen Hälfte eines Herzens mit LVNC-      |      |
| Symptomatik                                                                            | 15   |
| Abbildung 15: Schematische Darstellung des PCR-Zyklus                                  | 21   |
| Abbildung 16: Molekulargewichtsmarker VIII                                             | 24   |
| Abbildung 17: Prinzip der DNA-Sequenzierung nach der Didesoxy-Methode nach Sanger.     | 27   |
| Abbildung 18: Gelelektrophorese-Ergebnisse zur Überprüfung der PCR am Beispiel vom     |      |
| Exon 20.                                                                               | 30   |
| Abbildung 19: Ausschnitt der Sequenz mit der Variation in Exon 14 bei Patient NC-6     | 34   |
| Abbildung 20: Strukturformeln der Aminosäuren Prolin und Serin und ihre Eigenschaften. | 34   |
| Abbildung 21: Ausschnitt der Sequenz mit der Variation in Exon 14 bei Patient NC-42    | 35   |
| Abbildung 22: Strukturformeln der Aminosäuren Prolin und Leucin und ihre Eigenschafte  | n35  |
| Abbildung 23: Ausschnitt der Sequenz mit der Variation in Exon 20 bei Patient NC-45    | 36   |
| Abbildung 24: Ausschnitt der Wildtypsequenz in Exon 20 bei Patient NC-44               | 36   |
| Abbildung 25: Strukturformeln der Aminosäuren Alanin und Valin und ihre Eigenschaften  | n.37 |
| Abbildung 26: Ausschnitt der Sequenz mit der Variation in Exon 25 bei Patient NC-26    | 37   |

| Abbildung 27: Ausschnitt der Sequenz mit der Variation in Exon 25 bei Patient NC-26 | zeigt   |
|-------------------------------------------------------------------------------------|---------|
| Die heterozygote Variation (Ala1045Ser)                                             | 38      |
| Abbildung 28: Strukturformeln der Aminosäuren Alanin und Serin und ihre Eigenscha   | ıften38 |
| Abbildung 29: Ausschnitt der Sequenz mit der Variation in Exon 26 bei Patient NC-47 | '39     |
| Abbildung 30: Strukturformeln der Aminosäuren Glycin und Alanin und ihre            |         |
| Eigenschaften                                                                       | 39      |
| Abbildung 31: Schematische Darstellung des MYOM-2-Gens und der neu gefundenen       |         |
| Variationen                                                                         | 40      |
| Tabellenverzeichnis                                                                 |         |
| Tabelle 1: PCR Programm                                                             | 22      |
| Tabelle 2: PCR Standard Ansatz                                                      | 22      |
| Tabelle 3: PCR Ansatz mit Betain- und DMSO-Zusatz                                   | 23      |
| Tabelle 4: 3% iges Agarosegel (1 Gel)                                               | 23      |
| Tabelle 5: Auftragspuffer                                                           | 24      |
| Tabelle 6: 5xTBE-Puffer für 1 Liter                                                 | 24      |
| Tabelle 7: Enzymatische Aufreinigung                                                | 25      |
| Tabelle 8: Ansatz für die enzymatische Aufreinigung                                 | 25      |
| Tabelle 9: Ansatz für Cycle-Sequencing                                              | 26      |
| Tabelle 10: Thermocyclerprogramm zum Sequenzieren                                   | 26      |
| Tabelle 11: Pufferkomponenten                                                       | 28      |
| Tabelle 12: HinfI Verdau                                                            | 29      |
| Tabelle 13: TfiI Verdau                                                             | 29      |
| Tabelle 14: Alle gefundenen synonymen bekannten Variationen in MYOM-2               | 32      |
| Tabelle 15: Alle gefundenen bekannten/nicht-synonyme Variationen in MYOM-2          | 33      |
| Tabelle 16: alle gefundenen unbekannte/ synonyme Variationen in MYOM-2              | 33      |
| Tabelle 17: alle gefundenen unbekannte/nicht-synonyme Variationen in MYOM-2         | 34      |
| Tabelle 18: Darstellung der Konservierung des MYOM-2-Genabschnittes mit den Mut     | ationen |
| in Exon 14                                                                          | 36      |
| Tabelle 19: Darstellung der Konservierung des MYOM-2-Genabschnittes mit den Mut     | ationen |
| in Exon 20.                                                                         | 37      |
| Tabelle 20: Darstellung der Konservierung des MYOM-2-Genabschnittes mit den Mut     | ationen |
| in Exon 25                                                                          | 38      |

# Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

| Tabelle 21: Darstellung der Konservierung des MYOM-2-Genabschnittes mit den Mutat     | ionen |
|---------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| in Exon 26.                                                                           | 39    |
| Tabelle 22: Erwartete und tatsächliches Schnittmuster mutierter und Wildtyp-DNA [bp]. | 40    |
| Tabelle 23: Variationen Nachweis bei Kontrollkollektiv                                | 41    |
| Tabelle 24: Auflistung aller Ergebnisse der genetischen Analyse dieser Arbeit         | 42    |

# Anhang

# A) Daten zum MYOM-2-Gen

| Exon/<br>Intron | Exonlänge<br>[bp] | Intronlänge<br>[bp] | Kodon-<br>Phase |
|-----------------|-------------------|---------------------|-----------------|
| 1               | 0 (79)            | 5585                |                 |
| 2               | 107(119)          | 1288                | 0               |
| 3               | 156               | 5034                | II              |
| 4               | 139               | 136                 | 0               |
| 5               | 158               | 1375                | 0               |
| 6               | 93                | 10030               | II              |
| 7               | 89                | 80                  | II              |
| 8               | 51                | 2808                | I               |
| 9               | 165               | 829                 | I               |
| 10              | 162               | 2640                | I               |
| 11              | 142               | 2452                | I               |
| 12              | 200               | 626                 | II              |
| 13              | 54                | 5700                | I               |
| 14              | 128               | 4308                | I               |
| 15              | 184               | 2159                | 0               |
| 16              | 175               | 1448                | I               |
| 17              | 122               | 2168                | II              |
| 18              | 188               | 2412                | I               |
| 19              | 127               | 1852                | 0               |
| 20              | 179               | 1612                | I               |
| 21              | 115               | 3460                | 0               |
| 22              | 157               | 92                  | I               |
| 23              | 107               | 2189                | II              |
| 24              | 45                | 564                 | I               |
| 25              | 137               | 6429                | I               |
| 26              | 145               | 113                 | 0               |
| 27              | 60                | 1604                | I               |
| 28              | 68                | 5383                | I               |
| 29              | 114               | 189                 | 0               |
| 30              | 88                | 536                 | 0               |
| 31              | 39                | 5024                | I               |
| 32              | 106               | 11425               | I               |
| 33              | 164               | 254                 | II              |
| 34              | 37                | 1199                | I               |
| 35              | 23                | 1002                | II              |
| 36              | 56                | 1207                | I               |
| 37              | 318 (785)         |                     | 0               |

# B) Primersequenzen

| Primer für MYOM-2      | Sequenz                                                                      |
|------------------------|------------------------------------------------------------------------------|
| MYOM2-2F               | 5' TGG AGT TCA TTT TCC CCT TTG G 3'                                          |
| MYOM2-2R               | 5' TGA CGG AAC TGG AAA AGC CTT T 3'                                          |
| MYOM2-3F               | 5' TGC ATA TAC CAG TGG TTT GGG G 3'                                          |
| MYOM2-3R               | 5' AAC AGC AGC ATT CTC CCT CTC A 3'                                          |
| MYOM2-4F               | 5' GCA TGG CAT TCA CAC ACC AAA A 3'                                          |
| MYOM2-4R               | 5' CCC CTT GAG CAC CAT GCA GA 3'                                             |
| MYOM2-5F               | 5' GGT GTC TGG GAA GCG TGG ACT A 3'                                          |
| MYOM2-5R               | 5' GCA CAG GTT CAA TGG CGT TTG T 3'                                          |
| MYOM2-6F               | 5' GGG CAG AAT TGC ACA CAC ACA A 3'                                          |
| MYOM2-6R               | 5' CCC AGA TGC CAT TAC CTT TCC C 3'                                          |
| MYOM2-7+8F             | 5' CAC GCC ATG TGA TTT GCT TTC G 3'                                          |
| MYOM2-7+8R             | 5' TCC AGC CTG GGT GAC AGA GTG A 3'                                          |
| MYOM2-9F               | 5' CAA CAG AGC GAG ACT CCG TCC C 3'                                          |
| MYOM2-9R               | 5' GGA TGA AGT TCA AGG CGA ACG G 3'                                          |
| MYOM2-10F              | 5' CTG GTG TCC CCG AGG CTT TCT T 3'                                          |
| MYOM2-10R              | 5' TCC CGA TTC TTC CGT CTG CTC A 3'                                          |
| MYOM2-11F              | 5' CCA ACC CGC CAG AGT AAG AAA T 3'                                          |
| MYOM2-11R              | 5' GCC AAT CAA AAA ATG GGA ACG T 3'                                          |
| MYOM2-12F              | 5' AGC AGC AAA GAT TTT ACT GGC G 3'                                          |
| MYOM2-12R              | 5' TTG GGA GGG AAA GAG ACA ACA A 3'                                          |
| MYOM2-13F              | 5' CAG AAT GAG GGA AAA CGG GCT T 3'                                          |
| MYOM2-13R              | 5' GGG GCG TTC TCT GTC CAT CTC T 3'                                          |
| MYOM2-14.2F            | 5' TGG CTG ATC TTT ATT GGT GCC TTA 3'                                        |
| MYOM2-14.2R            | 5' CGC AGA GAT CAC GAC AGT GAG G 3'                                          |
| MYOM2-14.4F            | 5' TTT CGG GTGCAA TGC CTG GTT TCT 3'                                         |
| MYOM2-14.4R            | 5' AGT GGG GGG CCA GAG ATC ATG ACA 3'                                        |
| MYOM2-15F              | 5' CAT TTC TTC CTC CAC ACG C 3'                                              |
| MYOM2-15R              | 5' AGC CTA CAC ATG GAC CCC TGA A 3'                                          |
| MYOM2-16F              | 5' TCT TCC AAA GCC CCC AGT CTG 3'                                            |
| MYOM2-16R              | 5' AGG GGA AAA AAA ACA GGT TCT GGA 3'<br>5' GCG TTC AGG GTG ATT TTT GCT T 3' |
| MYOM2-17F<br>MYOM2-17R | 5' TCC CCT TTT CC CTT CAA TGA 3'                                             |
| MYOM2-17K              | 5' GTC TCC ACG TTG CTT CCT CCT C 3'                                          |
| MYOM2-18R              | 5' CGC AGA AAC ATT GCC AAA AAT G 3'                                          |
| MYOM2-19F              | 5' TGG TCC AAT TTC CCG ACA AGG T 3'                                          |
| MYOM2-19R              | 5' CGG AGG AAC AGA CAC GCT GTG A 3'                                          |
| MYOM2-20F              | 5' GCA CCC TCC TTA CCC TGC TCT G 3'                                          |
| MYOM2-20R              | 5' TGC TGG GAT TAC AGG CAT GAG C 3'                                          |
| MYOM2-22+23F           | 5'CGG AGC CAA ACC ATA TCA CCC TC3'                                           |
| MYOM2-22+23R           | 5' TAT ACA TAG CCC CCA CCG CCA G 3'                                          |
| MYOM2-24F              | 5' AAT CTT GCT CGT GTG TCG CCT TG 3'                                         |
| MYOM2-24R              | 5'CCA TCC TTT CCC CAA AGC TGT TC 3'                                          |
| MYOM2-25F              | 5' TGG CAT GAG GCT TTA GAG GCA A 3'                                          |
| MYOM2-25R              | 5' TCA ACC TTC CAT GCC CCA ATC T 3'                                          |
| MYOM2-26+27F           | 5' CAC CCA GAG GTT TCC TTG ATA AAA T 3'                                      |

# Anhang

| MYOM2-26+27R | 5' TGC TTC TGA CAA ATA CTC CAA TCG 3' |
|--------------|---------------------------------------|
| MYOM2-28F    | 5' GCT ATT GTG TTC TGC CAA AAA TGC 3' |
| MYOM2-28R    | 5' CGT TTC CTC ACC AGC ATC ACA G 3'   |
| MYOM2-29+30F | 5' GGG GGG GCT CTG TGA TTT AAG A 3'   |
| MYOM2-29+30R | 5' GAC CTG CCT TCA GAA TAC ATC CCA 3' |
| MYOM2-31F    | 5' TCA TCA GAA GCC AAG CAA CGC A 3'   |
| MYOM2-31R    | 5' TCC CAC AGA ACA CGC ACC ACA G 3'   |
| MYOM2-32F    | 5' GTG GGG ACA GGA GGG CTT GC 3'      |
| MYOM2-32R    | 5' GTG CCT TGA TGT TCC CCA GGG 3'     |
| MYOM2-33+34F | 5' TGC CCT GTA GAC ATT GTG CGT G 3'   |
| MYOM2-33+34R | 5' CCC ACA TGC AGC CAA AAC GA 3'      |
| MYOM2-35F    | 5' GGC AGT GGG AAC CAT CAG GAA A 3'   |
| MYOM2-35R    | 5' TAT GGA CAC TTT TGC CCC ACC C 3'   |
| MYOM2-36F    | 5' TTA CAT GGC TCC TGC TCC GTG G 3'   |
| MYOM2-36R    | 5' CTC TGC TCC GCC CCA AGA GAA G 3'   |
| MYOM2-37F    | 5' TCC GAG GGG GTG ACA TGA CTT T 3'   |
| MYOM2-37R    | 5' CAG CCC ACA CAG GAC ACC ACT C 3'   |

# C) PCR-Bedingungen für alle Exons des MYOM-2-Gens

| Exon  | Fragment-  | Annealing       | Zyklenzahl |
|-------|------------|-----------------|------------|
|       | länge (bp) | Temperatur (°C) |            |
| 2     | 294        | 56              | 83         |
| 3 4   | 415        | 61              | 38         |
| 4     | 410        | 64              | 38         |
| 5     | 366        | 68              | 35         |
| 6     | 417        | 69              | 38         |
| 7+8   | 615        | 65              | 38         |
| 9     | 439        | 64              | 38         |
| 10    | 441        | 68              | 35         |
| 11    | 419        | 66              | 35         |
| 12    | 417        | 66              | 35         |
| 13    | 214        | 68              | 38         |
| 14    | 654        | 58              | 38         |
| 15    | 580        | 65              | 38         |
| 16    | 547        | 60              | 35         |
| 17    | 314        | 58              | 38         |
| 18    | 366        | 54              | 35         |
| 19    | 370        | 52              | 38         |
| 20    | 497        | 69              | 38         |
| 21    | 461        | 69              | 38         |
| 22+23 | 581        | 70              | 38         |
| 24    | 237        | 66              | 38         |
| 25    | 469        | 64              | 38         |
| 26+27 | 545        | 51              | 35         |
| 28    | 345        | 61              | 39         |
| 29+30 | 562        | 63              | 38         |
| 31    | 462        | 62              | 36         |
| 32    | 295        | 64              | 38         |
| 33+34 | 587        | 56              | 38         |
| 35    | 287        | 66              | 38         |
| 36    | 206        | 59              | 36         |
| 37    | 494        | 64              | 38         |

## **Eidesstattliche Versicherung**

"Ich, Setareh Saleh-Edeş, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: "Genetische Analyse des M-Banden-Proteins Myomesin 2 bei Patienten mit linksventrikulärer Non-Compaction-Kardiomyopathie" selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe "Uniform Requirements for Manuscripts (URM)" des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst."

| Datum | Unterschrif | t |
|-------|-------------|---|
|       |             |   |

## Lebenslauf

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

## **Danksagung**

Mein Dank gilt in erster Linie Herrn Prof. Dr. med. Cemil Özcelik für die Bereitstellung des Dissertationsthemas und Herrn Dipl.-Ing. Andreas Perrot für seine freundliche und geduldige Betreuungsart und stetige Bereitschaft mir bei allen theoretischen und praktischen Fragen und Problemen zur Seite zu stehen.

Ein weiterer Dank geht an meine Kommilitonen Herrn Dr. Klaus Donandt, Frau Dr. Zvetelina Vassileva, sowie an alle Mitarbeiter/-innen des KardioGenetischen Labors für die nette Zusammenarbeit und die angenehme Arbeitsatmosphäre.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern für ihre stetige Unterstützung in jeglicher Hinsicht, der Ermöglichung meines Studiums und ihres Vertrauens in mich.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei meinem Ehemann Inan Edeş für den kontinuierlichen Beistand, die Motivation und dauerhafte Hilfsbereitschaft sowohl in der Zeit vor dem Studium als auch während des Studiums und meiner Dissertation bedanken.