

Aus dem KardioGenetischen Labor des
Experimental and Clinical Research Centers (ECRC)
am Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin
der Medizinischen Fakultät Charité –
Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Genetische Analysen des N-Cadherin-Gens bei
Patienten mit Non-Compaction-Kardiomyopathie**

**Genetische Analysen des N-Cadherin-Gens bei
Patienten mit hypertropher Kardiomyopathie**

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Klaus Donandt
aus Berlin

Gutachter:

1. Priv.-Doz. Dr. med. C. Öczelik
2. Priv.-Doz. Dr. med. J. Fielitz
3. Priv.-Doz. Dr. med. T. Neumann

Datum der Promotion: 01.02.2013

*Darin besteht das Wesen der Wissenschaft. Zuerst denkt man an etwas,
das wahr sein könnte. Dann sieht man nach, ob es der Fall ist,
und im Allgemeinen ist es nicht der Fall.*

(Bertrand Russell, brit. Philosoph und Mathematiker, 1950)

Inhaltsverzeichnis

I. Einleitung	1
1. Kardiomyopathien	1
2. Non-Compaction-Kardiomyopathie (NC)	2
2.1. Ätiologie	2
2.2. Pathogenese	2
2.3. Symptome	4
2.4. Diagnostik	4
2.5. Therapie	5
2.6. Prognose	6
3. Hypertrophe Kardiomyopathie (HCM)	6
3.1. Ätiologie	7
3.2. Pathogenese	7
3.3. Symptome	8
3.4. Diagnostik	8
3.5. Therapie	8
3.6. Prognose	9
4. Zell-Zellverbindungen	9
5. Cadherin-Familie	10
6. N-Cadherin	11
7. Zielsetzung der Arbeit	14
II. Patienten, Material und Methoden	15
1. Patienten	15
2. Material	15
2.1. Geräte	15
2.2. Verbrauchsmaterial	16
2.3. Chemikalien	17
2.4. Enzyme	17
2.5. Nukleotide	18
2.6. DNA-Molekulargewichtsmarker	18
2.7. Pufferlösungen	18

3. Methoden	19
3.1. Isolierung der DNA	19
3.2. Primerdesign	19
3.3. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	21
3.4. Sequenzierung	25
3.5. Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismen-Analyse	29
III. Ergebnisse	33
1. PCR-Optimierung und -Durchführung	33
2. Sequenzierung	35
2.1. Ergebnisse der Sequenzierung der NC-Patienten	36
2.2. Ergebnisse der Sequenzierung der HCM-Patienten	37
2.3. Ergebnisse der Screening-Untersuchung des gesunden Kontrollkollektivs und des HCM-Kontrollkollektivs	42
3. Eigenschaften der Aminosäuren	43
4. Konservierung der Aminosäuresequenz	44
5. Klinische Befunde der Patienten	45
IV. Diskussion	46
1. Methodenkritik	46
2. Genetische Varianten	47
V. Zusammenfassung	52
VI. Literaturverzeichnis	53
VII. Abbildungsverzeichnis	60
VIII. Tabellenverzeichnis	62
IX. Abkürzungsverzeichnis	63
X. Selbstständigkeitserklärung	65

I. Einleitung

Auf der Suche nach den Ursachen von Erkrankungen wird immer häufiger ein Zusammenhang mit einer Veränderung des Erbguts festgestellt. Diese Veränderungen können entweder die auslösende Ursache sein oder als verstärkender Faktor auf das Krankheitsgeschehen einwirken. In der Kardiologie sind hierbei vorzugsweise Erkrankungen des Herzmuskels (Kardiomyopathien) und Herzrhythmusstörungen zu nennen. Die zentrale Bedeutung des Herzens legt eine möglichst umfassende Untersuchung der Ursachen zur Entwicklung neuer Behandlungsstrategien nahe.

1. Kardiomyopathien

Kardiomyopathien sind eine heterogene Gruppe von Krankheiten des Herzmuskels, die mit mechanischen und / oder elektrischen Funktionsstörungen einhergehen und üblicherweise aber nicht zwingend eine 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 Systemerkrankung. Sie führen oft zu kardiovaskulär bedingten Todesfällen oder einer fortschreitenden Behinderung durch Herzversagen (Maron 2006).

Kardiomyopathien sind in zwei Klassen eingeteilt. Primäre Kardiomyopathien sind ausschließlich oder vorwiegend auf den Herzmuskel begrenzt. Sie können eine genetische Ursache besitzen, erworben sein oder eine Mischform darstellen. Die hypertrophe Kardiomyopathie und die Non-Compaction-Kardiomyopathie werden den primären genetisch bedingten Kardiomyopathien zugeordnet, die dilatative Kardiomyopathie gehört zur Gruppe der gemischten und die Myokarditis zur Gruppe der erworbenen Formen der Kardiomyopathie.

Sekundäre Kardiomyopathien hingegen weisen eine pathologische Veränderung des Herzmuskels als Teil verschiedener systemischer Dysfunktionen auf.

Die häufigste Kardiomyopathie ist die dilatative Kardiomyopathie (DCM). Sie ist durch eine Dilatation und eine eingeschränkte systolische Funktion eines oder beider Ventrikel gekennzeichnet. Meistens finden sich auch dilatierte Vorhöfe. In fortgeschrittenen Stadien kann es zu einer Verdünnung der Herzwände kommen. Die Gesamtmasse des Herzmuskels ist allerdings oft erhöht (Erdmann 2008).

Die zweithäufigste Kardiomyopathie ist die hypertrophe Kardiomyopathie (HCM). Sie tritt durch eine ventrikuläre Hypertrophie ohne adäquate hämodynamische Belastung in Erscheinung, die vorwiegend den linken Ventrikel betrifft und histologisch durch eine irreguläre Anordnung von Myozyten gekennzeichnet ist (Bob 2001).

Die Non-Compaction-Kardiomyopathie (NC) ist eine seltene angeborene Erkrankung des linksventrikulären Myokards, die vermutlich auf eine gestörte myokardiale Morphogenese zurückzuführen ist (Erdmann 2008).

2. Non-Compaction-Kardiomyopathie (NC)

1984 beschrieben Engberding und Bender erstmals die NC. Im Laufe der Jahre gewann sie immer mehr an Bedeutung und wurde 2006 von der American Heart Association als primäre genetische Kardiomyopathie klassifiziert. Molekulargenetische Grundlagen, Diagnostik, Therapie und Prognose der NC sind noch nicht vollständig geklärt. Epidemiologische Zahlen zur Inzidenz schwanken zwischen 0,05% (Espinola-Zavaleta et al. 2006) und 0,25% (Stollberger et al. 2007), da die untersuchten Kollektive recht klein sind und die mangelnden Kenntnisse des Erscheinungsbildes zu einem häufigen Übersehen der Erkrankung führen.

2.1. Ätiologie

Die Ursache der NC ist eine Störung der embryonalen endomyokardialen Morphogenese, wobei es zu einem Arrest der Verdichtung der trabekulären Schicht kommt.

NC tritt sowohl sporadisch als auch familiär gehäuft auf (Oechslin et al. 2000; Ichida et al. 2001; Klaassen et al. 2008). Es wurde bereits in einem Fall eines familiären Auftretens eine Mutation im Tafazzin-Gen (Gen G4.5 auf Chromosom Xq28) nachgewiesen (Bleyle et al. 1997). Es handelt sich dabei um ein Enzym des Cardiolipin-Metabolismus.

2.2. Pathogenese

Das Myokard entwickelt sich aus einer trabekulären und einer kompakten Schicht. Die Grenze zwischen der trabekulären Schicht und dem blutgefüllten Ventrikellumen bildet

das Endokard. Die kompakte Schicht bildet sich subepikardial aus und bildet eine Grenze zwischen den Recessus und den koronaren Blutgefäßen (Allenby et al. 1988; Bernanke et al. 2002). Das spongiöse Maschenwerk des embryonalen Myokards besteht aus trabekulären Muskelfasern und wird von tiefen Recessus durchzogen. Erst zeitgleich mit der Entwicklung der Koronargefäße wandeln sich die Recessus in Kapillaren um oder bilden sich zurück. Dieser Vorgang beginnt an der Herzspitze am Epikard und breitet sich in Richtung Endokard und zur Herzbasis aus (Agmon et al. 1999; Bernanke et al. 2002; Freedom et al. 2005).

Eine Störung, die zu einem Stillstand in diesem Teil der embryonalen Morphogenese führt, wird als pathogenetische Ursache der NC erachtet (Weiford et al. 2004; Freedom et al. 2005; Engberding et al. 2007).

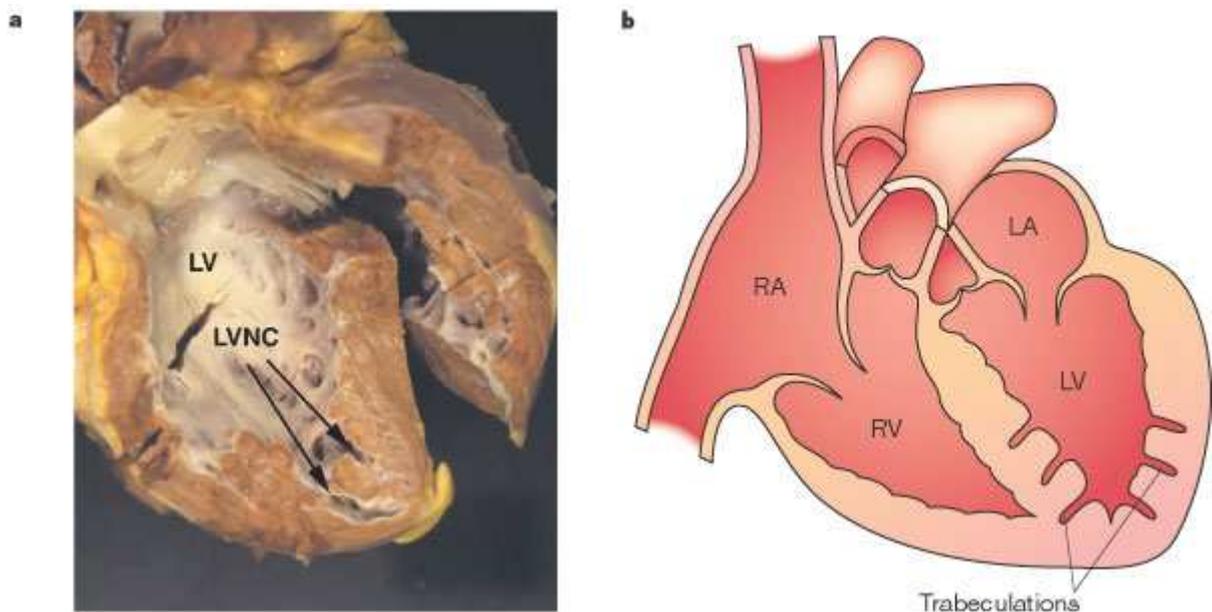


Abbildung 1: a) Schnittpreparat eines Herzens mit NC. Auffällig ist die schwammartige Wand des linken Ventrikels, die durch die Anschnitte tiefer Trabekel (Pfeile) dargestellt wird. LV, linker Ventrikel; LVNC, Trabekel des linken Ventrikels. **b)** Schema der NC: Die Wand des LV ist dick und stark trabekularisiert, die linke Kammer ist dilatiert (Towbin et al. 2002).

Auch im gesunden Myokard ist die Verdichtung im linken Ventrikel ausgeprägter als im Rechten, wodurch die Diagnose einer pathologischen Non-Compaction von der Normvariante in diesem Bereich schwer abzugrenzen ist (Oechslin et al. 2000; Jenni et al. 2001). Es wird daher empfohlen auf die Beschreibung von nicht verdichteten Arealen im rechten Ventrikel zu verzichten (Jenni et al. 2001).

Da auch herzgesunde Patienten in bis zu 70% prominente Trabekel im linken Ventrikel aufweisen (Boyd et al. 1987), wurde eine Trabekularisierung im linken Ventrikel bei mehr als drei Trabekeln apikal der Papillarmuskeln als pathologisch definiert (Stollberger et al. 2004).

Durch die Trabekularisierung kann es zu Störungen der Mikrozirkulation im Ventrikel kommen, wodurch die histologisch nachweisbare subendokardiale Fibrose erklärt werden kann (Junga et al. 1999; Jenni et al. 2001; Jenni et al. 2002). Weiterhin könnte dies zu Kontraktionsstörungen auf Grund restriktiven Füllungsverhaltens und einer abnormen Relaxation während der Diastole führen (Agmon et al. 1999), wodurch die Symptome einer Herzinsuffizienz auftreten können, die bei vielen Patienten mit NC vorhanden sind.

2.3. Symptome

Das klinische Bild der NC kann durch Symptome einer Herzinsuffizienz sowie durch das Auftreten von Thrombembolien oder Arrhythmien gekennzeichnet sein.

Als Leitsymptom einer Herzinsuffizienz gilt die zunächst bei körperlicher Belastung, später auch in Ruhe auftretende Luftnot (Dyspnoe). Durch eine flache Lagerung wird diese Luftnot oft verschlechtert, was bei schwereren Fällen über nächtliche Atemnot und Hustenanfälle bis hin zum kardialen Lungenödem führen kann. Hierbei liegt ein Übertritt von Flüssigkeit in die Alveolen (Lungenbläschen) vor, der zu einem schaumigen Auswurf und „brodelnden“ Atemgeräuschen führt. Die Dyspnoe gilt vorrangig als Leitsymptom für die Linksherzinsuffizienz. Bei der erheblich selteneren Rechtsherzinsuffizienz bilden sich Wasseransammlungen vorwiegend in den Beinen (Beinödeme) oder im Bauchraum (Aszites).

2.4. Diagnostik

Die NC tritt bei allen Altersgruppen auf, wobei sich schwere Verläufe früher manifestieren als Mildere. Je nach Schweregrad können Symptome einer Herzinsuffizienz vorliegen. Patienten mit zusätzlichem Vorhofflimmern neigen durch die Blutstase in den tiefen Recessus vermehrt zu thrombembolischen Ereignissen. Im EKG zeigen sich unspezifi-

sche Auffälligkeiten wie ST-Strecken- und T-Wellen-Veränderungen, Vorhofflimmern, Schenkelblockbilder und ventrikuläre Tachyarrhythmien.

Zur Zeit gilt die Diagnosestellung mittels Echokardiographie als Methode der Wahl (Jenni et al. 2001; Sengupta et al. 2004; Engberding et al. 2007). Die diagnostischen Kriterien wurden wie folgt angegeben (Jenni et al. 2007):

1. Abwesenheit anderer kardialer Anomalien als unter 2.-4. genannt
2. Typische zweischichtige Struktur des Herzmuskels mit einer dünnen, kompakten äußeren (subepikardialen) Schicht und einer viel dickeren, nicht kompakten inneren (subendokardialen) Schicht aus einem Netz von Trabekeln und Recessus (das systolische Verhältnis zwischen nichtkompakter und kompakter Schicht ist > 2).
3. Die Veränderungen umfassen meist ($> 80\%$) die Herzspitze und die inferioren mittleren und lateralen Anteile der linksventrikulären Wand.
4. Nachweis von tiefen blutdurchströmten intertrabekulären Recessus im Farbdoppler.

Die kardiale Magnet-Resonanz-Tomographie (Kardio-MRT) gewinnt durch wachsende Kenntnisse auf Seiten der Untersucher zunehmend an Bedeutung für die Diagnosestellung (Junga et al. 1999; Alsaileek et al. 2008).

Für die Anwendung der Multislice-Computertomographie gibt es noch keine allgemein akzeptierten Kriterien. Sie ist allerdings geeignet, um nicht kompakte Areale zu identifizieren (Mohrs et al. 2007).

Eine zusammenfassende Arbeit (Stollberger et al. 2006) bereits publizierter Fälle mit primär falscher Diagnose bei der ersten echokardiographischen Untersuchung zeigte als Differentialdiagnosen die HCM, DCM, endokardiale Fibroelastose, Myokarditis, Perikarditis, restriktive Kardiomyopathie, linksventrikuläre Thromben, aberrierende Sehnenfäden, intramyokardiale Hämatome/Abszesse sowie kardiale Metastasen.

2.5. Therapie

Die Therapie folgt den Leitlinien der Herzinsuffizienztherapie (Toyono et al. 2001; Engberding et al. 2007). Bei eingeschränkter linksventrikulärer Funktion, Vorhofflim-

mern oder nachgewiesenen Thromben ist eine meist lebenslange, orale Antikoagulationstherapie indiziert (Oechslin et al. 2000; Weiford et al. 2004; Murphy et al. 2005). Eine Herztransplantation ist bei Herzinsuffizienz im Endstadium angebracht (Conraads et al. 2001; Jenni et al. 2002; Struber et al. 2009). Nach überlebtem Herzstillstand oder bei anhaltenden ventrikulären Tachykardien ist ein implantierbarer Kardioverter-Defibrillator (ICD) indiziert. Nach neuen Leitlinien der American Heart Association ist auch die primärprophylaktische Implantation bei Patienten mit NC zugelassen (Epstein et al. 2008).

In betroffenen Familien sollten auf Grund familiärer Häufung Screening-Untersuchungen durchgeführt werden (Stollberger et al. 2002; Sengupta et al. 2004; Murphy et al. 2005).

2.6. Prognose

Kürzlich von der „Italian Society of Echocardiography“ veröffentlichte Daten sprechen für eine ernste Prognose bei symptomatischen Patienten mit NC (Corrado et al. 2008). Bei asymptomatischen Patienten ist die Prognose optimistischer und, sofern keine Herzrhythmusstörungen oder linksventrikuläre Funktionsstörungen vorliegen, keine Therapie erforderlich. Die Therapie wird größtenteils durch den Umfang der Herzinsuffizienz, den Schweregrad der Arrhythmien und durch das Risiko für Thrombembolien bestimmt. Durch frühzeitige Diagnosestellung, mindestens halbjährliche Kontrolluntersuchungen (Murphy et al. 2005) und Screeninguntersuchungen der Familien sowie aggressive Therapiestrategien wie ICD-Implantation und Listung zur Herztransplantation (Oechslin et al. 2000; Sato et al. 2006) bei symptomatischen Patienten kann die Prognose eventuell verbessert werden.

Ob genetische Analysen in Zukunft eine bessere Einschätzung der Prognose ermöglichen, ist noch nicht absehbar.

3. Hypertrophe Kardiomyopathie (HCM)

Die HCM ist die häufigste hereditäre kardiale Erkrankung. Sie wird mit einer Inzidenz von einem Erkrankungsfall pro 500–1000 Menschen angegeben und ist der Hauptgrund

für den plötzlichen Herztod bei jungen asymptomatischen Personen (Dilsizian et al. 1993).

Die Erkrankung stellt sich meist durch eine idiopathische Verdickung des linksventrikulären, selten mit Beteiligung des rechtsventrikulären Myokards dar. Dabei liegen keine Anzeichen einer anderen kardialen oder systemischen Erkrankung vor, welche für die Hypertrophie verantwortlich sein könnten (z. B. Aortenklappenstenose, Hypertonie)

Zu unterscheiden ist die obstruktive (HOCM) von der nichtobstruktiven Form (HNCM) der hypertrophen Kardiomyopathie. Erstere liegt in etwa 70% der Fälle vor und geht mit einer linksventrikulären Ausflussstörung einher.

3.1. Ätiologie

Die HCM weist eine autosomal-dominante Vererbung auf. In etwa der Hälfte der Fälle tritt eine HCM familiär auf, andernfalls vermutlich als Neumutation (Bos et al. 2009).

Derzeit sind mehr als 27 Gene mit mehreren hundert Mutationen bekannt. Dabei handelt es sich überwiegend um sarkomerische Proteine, beispielsweise die schwere Kette des β -Myosins, das Myosinbindungsprotein C und das Troponin T. Diese drei Proteine sind zusammen für etwa 60% bis 70% der HCM verantwortlich (Bos et al. 2009). Desweiteren traten – wenn auch erheblich seltener – Mutationen in Troponin I, den leichten Ketten des Myosins, Titin, α -Tropomyosin, α -Actin und Muskel LIM Protein auf.

3.2. Pathogenese

Histologisch liegt eine Fehlorganisation der Myozyten („fiber disarray“) vor. Diese könnte, kombiniert mit der interstitiellen Fibrose, eine Kontraktilitätsstörung hervorrufen, wodurch das Myokard zur Kompensation durch Hypertrophie stimuliert wird (Maron et al. 1979; Maron et al. 1998).

Ein verengter Ausflusstrakt fördert die Progression der Hypertrophie durch Erhöhung des systolischen Druckes im linken Ventrikel (Maron et al. 2003b).

3.3. Symptome

Die HCM besitzt ein sehr heterogenes klinisches Erscheinungsbild. Sie kann asymptomatisch verlaufen oder den Patienten massiv in seiner Lebensqualität einschränken. Meist äußert sich dies in einer Dyspnoe und pectanginösen Beschwerden bei körperlicher Belastung sowie Synkopen, Palpitationen und Schwindel (Braunwald et al. 1964).

3.4. Diagnostik

Zur Diagnostik wird heute vorwiegend die zweidimensionale Echokardiographie eingesetzt. Alternativ stehen das kardiale MRT und das kardiale CT zur Verfügung. Gewöhnlich stellt sich dabei die Kapazität des linken Ventrikels verkleinert dar, die Wand ist verdickt (normale Wandstärke des LV < 12 mm) jedoch nicht dilatiert.

Da angenommen wird, dass jede Verdickung des Herzmuskels mit einer Mutation einhergeht, wird die Diagnose durch genetische Analysen gestützt. Desweiteren sollten Verwandte ersten Grades einem Screeningtest auf HCM unterzogen werden (Maron et al. 2003a).

Um die obstruktive von der nicht-obstruktiven Form zu unterscheiden, ist ein Provokationstest essenziell.

Bei 75% bis 95% der Patienten sind Veränderungen im Elektrokardiogramm (EKG) im Sinne einer linksventrikulären Hypertrophie feststellbar (Maron 2001). Ist keine EKG-Veränderung feststellbar, so schließt dies eine Erkrankung nicht aus; diese zeigt dann aber meist einen recht milden Verlauf (McLeod et al. 2009).

3.5. Therapie

Jeder Patient mit HCM sollte eine Risikostratifikation erhalten, um das Risiko eines plötzlichen Herztodes besser abschätzen und gegebenenfalls einen ICD implantieren zu können.

Es wird empfohlen auf Nikotin und Alkohol zu verzichten und sich regelmäßig körperlich im aeroben Bereich zu betätigen.

Die Therapie symptomatischer Patienten mit HCM entspricht dem therapeutischen Ansatz von herzinsuffizienten Patienten. Zur Behandlung von HOCM ist ergänzend meist die chirurgische Myektomie nach Morrow oder die perkutane Septumablation indiziert. Beide Verfahren weisen ähnlich gute Ergebnisse auf.

3.6. Prognose

Bei einer adäquaten Therapie ist heute eine hohe Lebensqualität der betroffenen Patienten mit einer annähernd normalen Lebensdauer zu erwarten.

4. Zell-Zell-Verbindungen

Zell-Zell-Verbindungen spielen bei den Erkrankungen des Herzmuskels eine wichtige Rolle. Diese Zell-Zell-Verbindungen bestehen aus einer Reihe von Proteinen, die den Kontakt zwischen dem Zytoskelett und den extrazellulären Verbindungsproteinen herstellen. Für viele dieser Proteine sind bereits genetische Veränderungen bekannt, die als ursächlich für Kardiomyopathien gelten. Beispielsweise verursachen manche Veränderungen im Plakoglobin-, Desmoglein- und Desmoplakinen eine arrhythmogene rechtsventrikuläre Kardiomyopathie (Pankuweit et al. 2008), Mutationen im Vinculingen eine dilatative Kardiomyopathie (Olson et al. 2002) und Mutationen im muscle LIM-Protein eine hypertrophe Kardiomyopathie (Gehmlich et al. 2004).

Die Kardiomyozyten sind miteinander über Glanzstreifen (Disci intercalares) verknüpft, welche verschiedene Arten von Verbindungselementen enthalten. Die Kraftübertragung und Stabilisierung des Zellverbandes wird durch desmosomen- (Maculae adhaerentes) und adhärenzkontaktähnliche (Fasciae adhaerentes) Strukturen gewährleistet. Allerdings sind diese Verbindungselemente im Glanzstreifen nicht streng räumlich getrennt wie beispielsweise in den Epithelien, sondern bilden einen Mischtyp – die sogenannte Area composita (Borrmann et al. 2006; Franke et al. 2006; Pieperhoff et al. 2007).

Area composita

Dieser hochmolekulare, myokardspezifische Proteinkomplex besteht unter anderem aus Plakophilinen, Desmoplakin, Cateninen (α - und β -Catenin, Plakoglobin (γ -Catenin)),

desmosomalen Cadherinen (Desmoglein (Dsg-2), Desmocollin (Dsc-2)) sowie dem N-Cadherin als einzigen klassischen Cadherin.

Im Bereich der Area composita nähern sich die Zellmembranen benachbarter Zellen auf 20 nm an. Die intrazelluläre submembrane Plaque in dieser Region, die der Verankerung des Zytoskeletts dient, besitzt einen Durchmesser von etwa 10 nm bis 30 nm (Aberle et al. 1996).

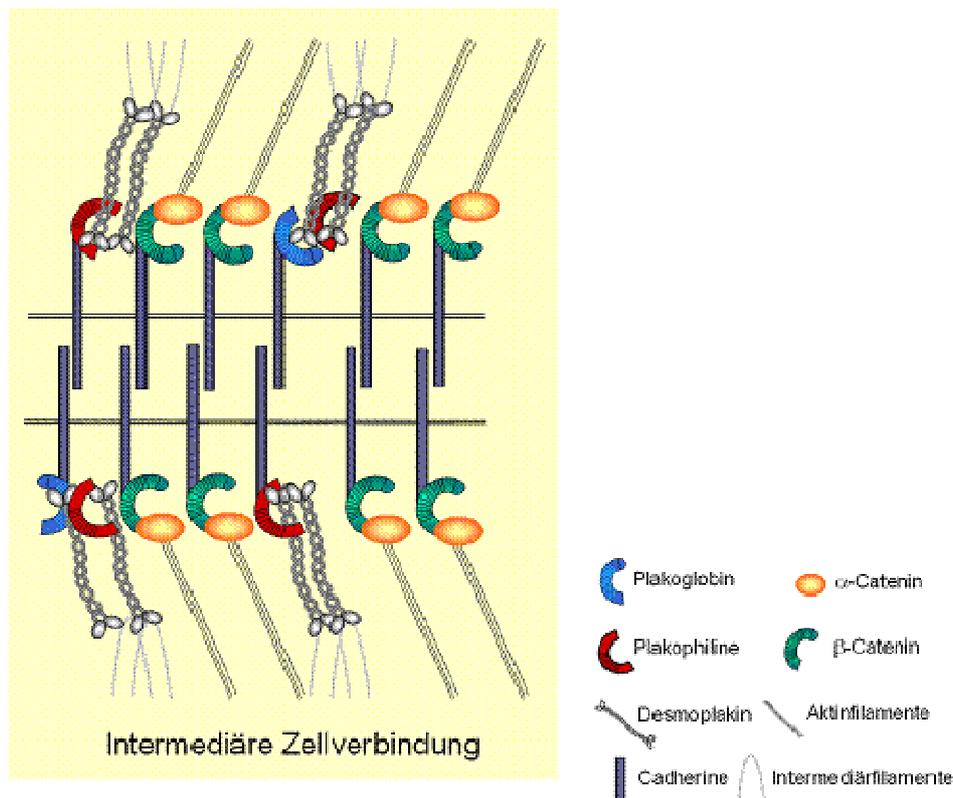


Abbildung 2: Die Area composita stellt eine intermediäre Zellverbindung dar, welche sowohl aus desmosomalen Proteinen, als auch aus Proteinen der Adhärenzverbindung besteht (Großmann 2006). Die Cadherine bilden eine transmembrane Verknüpfung zweier benachbarter Zellen. An ihre zytosolischen Bereiche lagern sich entweder Plakoglobin (blau) und Plakophilin (rot), welche über Desmoplakine (grau) an den Intermediärfilamenten verankern, oder β-Catenin (grün) bzw. Plakoglobin, welche über α-Catenin (orange) an den Aktinfilamenten verankern.

5. Cadherin-Familie

Der Name Cadherine leitet sich aus dem Englischen ab und steht für „Calcium adhering“ (deutsch: „Calcium haftend“). Cadherine sind transmembrane Glykoproteine, deren Funktion Calcium-abhängig ist. Derzeit sind aus der Superfamilie der Cadherine

mehr als 300 Proteine bekannt, von denen über 80 im menschlichen Organismus nachgewiesen werden konnten (Yagi et al. 2000). Cadherine treten in Desmosomen und in Adhärenzverbindungen sowie in der Area composita im Glanzstreifen des Herzmuskels auf und vermitteln den Zellkontakt und die mechanische Stabilität. Sie haben weitere wichtige Funktionen bei der embryonalen Morphogenese, der Signaltransduktion und der Zellpolarität.

Cadherine sind transmembrane Proteine mit einem intrazellulären, einem transmembranen und einem extrazellulären Teil. Die hohe Anzahl an Mitgliedern in der Familie kommt durch Veränderungen am extrazellulären Teil zustande (Angst et al. 2001). Dieser extrazelluläre Teil besteht unter anderem aus mehreren Domänen, den sogenannten Cadherin-Repeats, die evolutionär sehr hoch konserviert sind. Calcium-Ionen binden an diese negativ geladenen Domänen und üben somit Wechselwirkungen auf andere Cadherin-Moleküle aus.

Die Cadherine werden je nach Domänenaufbau, Struktur und Größe in verschiedene Untergruppen eingeteilt: es gibt klassische Cadherine, desmosomale Cadherine, Protocadherine, 7-Transmembran-Cadherine (auch Flamingo Cadherine genannt), T-Cadherine und FAT-family Cadherine (Angst et al. 2001). Da in dieser Arbeit das Gen des N-Cadherins untersucht wurde, soll im Folgenden nur auf die Gruppe der klassischen Cadherine eingegangen werden.

Zu der Untergruppe der klassischen Cadherine, die genau fünf Cadherin-Repeats aufweisen, gehören die Typ I- und die Typ II-Cadherine. Die Typ I-Cadherine wie das N-Cadherin und das E-Cadherin umfassen insgesamt über 30 verschiedene Proteine. Sie besitzen eine HAV-Sequenz (Histidin-Alanin-Valin) im ersten Cadherin-Repeat, die für die Zell-Zell-Adhäsion essentiell ist (Steinberg et al. 1999). Die Bezeichnungen E- beziehungsweise N-Cadherin beschreiben die Orte ihrer erstmaligen Entdeckung wie E für endothelial und N für neuronal. Klassische Cadherine vom Typ II besitzen keine HAV-Sequenz. Ein Beispiel hierfür ist das VE-Cadherin (vaskular endothel).

6. N-Cadherin

Das N-Cadherin, auch als Cadherin-2 (CDH-2) bezeichnet, wird durch das CDH-2-Gen kodiert. Es gehört zur Untergruppe der klassischen Cadherine Typ I und ist ein Calcium-

abhängiges Glykoprotein, welches der Zell-Zell-Adhäsion dient. Im Herzmuskel wird es stark exprimiert. Es ist für die Gastrulation und die asymmetrische Entwicklung von Organen (Garcia-Castro et al. 2000), sowie für die Adhäsion zwischen prä- und postsynaptischer Membran und in der Area composita der Glanzstreifen von Bedeutung.

Das menschliche N-Cadherin-Gen auf Chromosom 18q11.2 besteht aus 16 Exons und ist auf einer etwa 227 kb langen Region kodiert. Es wurde eine hohe Konservierung und eine starke Ähnlichkeit zu anderen Cadherinen nachgewiesen (Wallis et al. 1994). Die fünf extrazellulären Cadherin-Repeats, die Transmembranregion und die Zytoplasmadomäne werden durch die Exons 4 bis 13, 13 und 14 und 14 bis 16 kodiert (Harada et al. 2002).

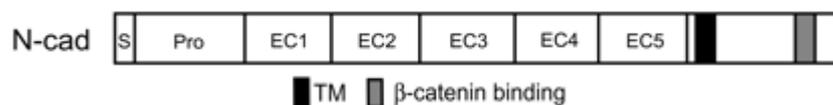


Abbildung 3: schematischer Aufbau eines N-Cadherins. Gezeigt ist der zytoplasmatische Abschnitt mit der β -Catenin-Bindungsstelle, an die das Plakoglobin bindet, sowie die transmembrane Region (TM) und der extrazelluläre Bereich mit den fünf Cadherin-Repeats, welche vom N-Terminus aus nummeriert werden. Die HAV-Sequenz befindet sich im Bereich des EC1. Über ein Propeptid ist der EC1 an eine Signalsequenz am N-Terminus gebunden (Okuda et al. 2007).

Cadherine sind in ihrer Funktion von der Calcium-Konzentration abhängig. Sinkt die Calcium-Konzentration stark ab, so trennen sich die Dimere von denen der Nachbarzelle und heben auch ihre cis-Dimerisierung untereinander auf. Bei weiterer Reduktion der Calcium-Konzentration verlieren die Monomere ihre stabförmige Konformation. Diese Betrachtung ist für Kardiomyopathien allerdings eher theoretischer Natur, da die Calciumkonzentration im Extrazellulärraum etwa 3000 μ M beträgt und somit selbst bei einem massiven Calciumverlust eher durch eine Übererregbarkeit des Nervensystems zum Tode führen würde, als dass sich die interzelluläre Dimerisierung aufheben würde.

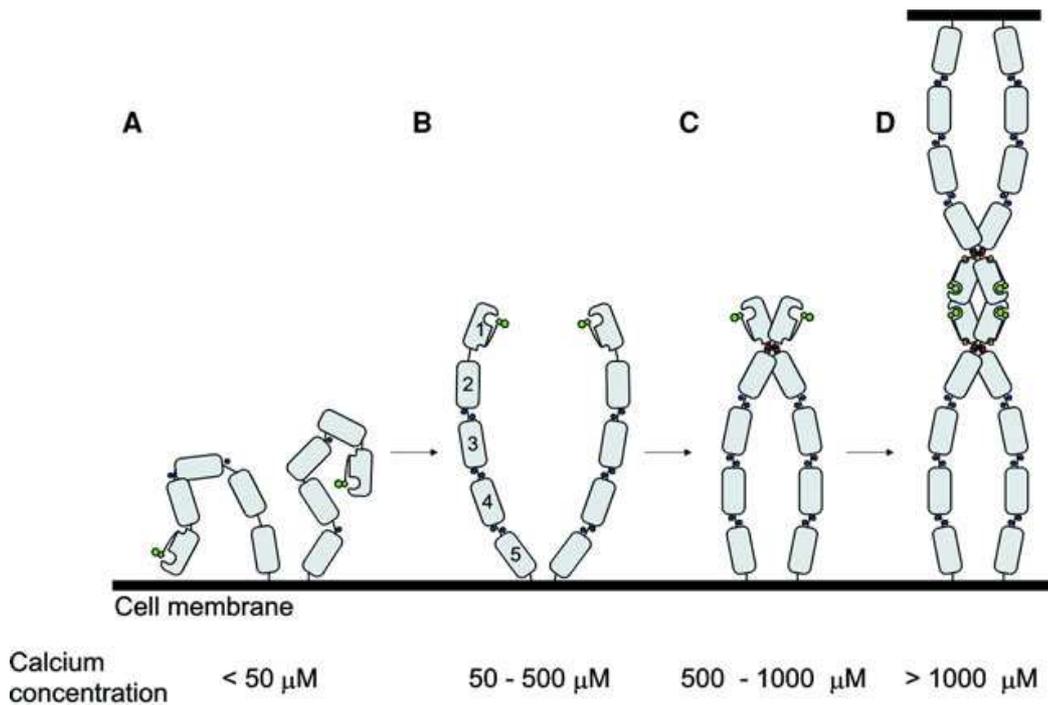


Abbildung 4: Schema für die Wirkung der Calcium-Ionenkonzentration auf Cadherine. Niedrige Calcium-Konzentrationen stabilisieren die monomere stabförmige Struktur (A und B), mittlere und hohe Konzentrationen bewirken eine cis-Dimerisierung (C) und eine trans-Interaktion der Trp2-Domänen verschiedener Zellen (D). Die gebundenen Calcium-Ionen sind als schwarze Kreise dargestellt. Die Cadherin-Repeats 1-5 sind als graue Blöcke aufgeführt. Die Trp2-Domänen mit ihren hydrophoben Kavitäten sind als grünes Symbol abgebildet (Pertz et al. 1999).

Die meisten Zellen exprimieren eine Vielzahl von Cadherin-Subtypen. Die Herzmuskelzelle hingegen besitzt nur ein einziges klassisches Cadherin – das N-Cadherin. Dieses wird während der Entwicklung und Reifung des Herzmuskels sehr stark exprimiert und ist hauptsächlich in den Regionen der Area composita von Kardiomyozyten zu finden (Kostetskii et al. 2005).

Luo et al. zeigten 2001, dass die N-Cadherin-vermittelte Zelladhäsion ein essentielles Überlebenssignal für embryonale Zellen darstellt (Luo et al. 2001). Das N-Cadherin ist ein Schlüsselmolekül während der Gastrulation (Derycke et al. 2004) und bei der Entwicklung der Links-Rechts-Asymmetrie von Wirbeltieren (Garcia-Castro et al. 2000). Es scheint eine Rolle bei der Trabekularisierung des embryonalen Herzens (Ong et al. 1998), sowie bei der Verbindung von Myofibrillen zwischen benachbarten Myozyten und bei der Ausrichtung der beiden Schichten im sich entwickelnden Herzrohr (Shiraishi et al. 1993) zu spielen.

Eine Veränderung bestimmter Domänen des N-Cadherins, beispielsweise im Bindungsbereich der Tyrosin-Phosphatase PTP1B, kann zu einer Einschränkung der N-Cadherin-Funktion oder zum kompletten Funktionsverlust führen (Xu et al. 2002). Solche Veränderungen des N-Cadherins können die normale frühe Herzentwicklung und die Myogenese verhindern (Linask et al. 1997; Radice et al. 1997). Die Entwicklung von Arrhythmien kommt dabei wahrscheinlich durch Destabilisierung von Gap-Junctions auf Grund von Veränderungen des stabilisierenden N-Cadherin- / Catenin-Komplexes zustande (Li et al. 2005).

Die große Bedeutung des N-Cadherins für die regelgerechte Funktion des Myokards zeigt sich aber nicht ausschließlich während der Entwicklung, sondern konnte auch im Myokard von erwachsenen Knock-out-Mäusen nachgewiesen werden (Kostetskii et al. 2005).

7. Zielsetzung der Arbeit

Der hohe Anteil genetisch bedingter Kardiomyopathien lässt eine weitreichende Forschung auf diesem Gebiet sinnvoll erscheinen. Das Aufdecken neuer Krankheitsgene könnte das Verständnis für die Ätiologie der Erkrankungen verbessern und somit neue Möglichkeiten für Diagnostik und Therapieansätze offenbaren.

Sowohl bei der HCM als auch bei der NC ist ein genetischer Einfluss unumstritten. Häufig sind Proteine der Zell-Zell-Verbindungen von Mutationen betroffen, allerdings ist die vollständige Bedeutung vieler Gene für die Entwicklung von Kardiomyopathien noch nicht bekannt. Das im Glanzstreifen des Herzmuskels hochexprimierte N-Cadherin dient der Verbindung benachbarter Zellen und der Stabilisierung des Zytoskeletts. Einige Tierversuche deuten bereits durch den provozierten eingeschränkten oder vollständigen Funktionsverlust auf die wichtige Rolle des N-Cadherin-Gens – dem einzigen klassischen Cadherin im Herzmuskel – hin.

Ziel dieser Arbeit war die Aufdeckung von möglichen Mutationen im N-Cadherin-Gen und deren Charakterisierung. Diese Arbeit ist Teil eines Projekts zur Identifikation und Charakterisierung von genetischen Veränderungen, welche als Ursache für Kardiomyopathien in Frage kommen.

II. Patienten, Material und Methoden

1. Patienten

In dieser Arbeit wurden zwei Patientenkollektive untersucht. Das eine besteht aus 47 Patienten mit NC, das andere aus 58 Patienten mit HCM. Bei allen Patienten wurde eine HCM respektive eine NC nach geltenden klinischen Richtlinien diagnostiziert. Von sämtlichen Patienten wurde eine Einwilligung zur genetischen Untersuchung eingeholt. Ein positives Votum der Ethikkommission liegt vor. Es wurden Blutproben entnommen, aus denen die DNA für die weitere Untersuchung mittels eines Extraktionsroboters aus den Lymphozyten isoliert wurde. Die Proben wurden mit einer Konzentration von 25 ng/µl auf eine Mikrotiter-Platte pipettiert.

Als Kontrollkollektiv standen anonymisierte DNA-Proben von 350 Patienten, die weder an HCM noch an NC erkrankt waren, zur Verfügung. Diese Patienten wurden nach geltenden Kriterien untersucht und als negativ diagnostiziert.

Desweiteren standen 233 DNA-Proben von Patienten zur Verfügung, die an HCM erkrankt sind. Diese sollten die Bestimmung der Häufigkeit der Varianten ermöglichen. Die DNA des Kontrollkollektivs und der HCM-Patienten wies ebenfalls eine Konzentration von 25 ng/µl auf.

2. Material

2.1. Geräte

	Hersteller
ABI Prism 3100-Avant Genetic Analyzer	Applied Biosystems
Bio Doc Analyze	Biometra
Digital Graphic PrinterUP-D895	Sony
Dri-Block DB2A	Techne, Thermo-Dux
Flachbettgelkammer	ABgene
E-Centrifuge	Lab4You
Gelkammer Horizon 58	Gibco B

Magnetrührer RCT basic	IKA Labortechnik
Mikrowelle	AEG
MultiScreen Column Loader & Scraper	Millipore
Netzteil Power Pack P25	Biometra
Peltier Thermal Cycler PTC-100	MJ-Research, Biozym
Peltier Thermal Cycler PTC-200 Gradient	MJ-Research, Biozym
Peltier Thermal Cycler PTC-225 Gradient	MJ-Research, Biozym
pH-Meter Calimatic 765	Knick
Pipetten (µl) – 10; 20; 100; 200; 1000	Eppendorf
Picofuge	Stratagene
Reax 2000	Heidolph
Rotanta 460 R	Hettich
Thermocycler Professional 1000	Biometra
Thermocycler Professional Gradient1000	Biometra
UVstar (312nm)	Biometra
Waage 572-37	Kern

2.2. Verbrauchsmaterial

Hersteller

Deckelkette flach	Sarstedt
Filterplatten MAHV N45	Millipore
Nescofilm	Azwell
Multiply-Strip 0,2ml-Kette	Sarstedt
Pipettenspitzen	Sarstedt

2.3. Chemikalien

	Hersteller
Agarose	Biozym
Ammoniumpersulfat (APS)	AppliChem
Betaine	Serva
Borsäure	Roth
Bromphenolblau	Pierce
Dextranblau	Fluka
EDTA	Sigma
Ethanol	Roth
Ethidiumbromid	Roth
Salzsäure	Merck
Sephadex G-50 Superfine	GE Healthcare
Tris	Roth
Wasser	Roth
Xylencyanol	Pierce

2.4. Enzyme

	Hersteller
BigDye Terminator v1.1 Kit	Applied Biosystems
Exonuclease I, 20U/μl	New England Biolabs
Taq DNA-Polymerase, 5 U/μl	Roche
Shrimp Alkaline Phosphatase, 1U/μl	Promega
Bsml, 5000 U/μl	New England Biolabs

2.5. Nukleotide

dNTP-Mix (dATP, aTTP, dGTP, dCTP), 2 mM

DNA-Primerpaare NCAD

Hersteller

Roth

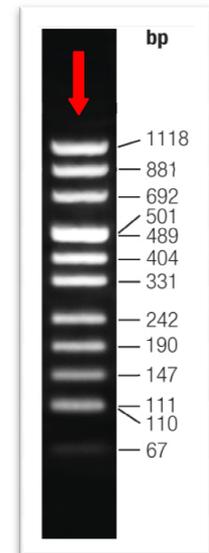
BioTeZ

2.6. DNA-Molekulargewichtsmarker

Marker VIII (67-1116 bp) Fermentas

Der Marker ermöglicht eine relativ genaue Längenbestimmung der Fragmente nach der Agarosegelelektrophorese.

Abbildung 5: Bandenmuster des Molekulargewichtsmarkers VIII auf einem Agarosegel. Der Pfeil gibt die Wanderungsrichtung an (Fermentas International Inc.).



2.7. Pufferlösungen

5 x TBE-Puffer, pH 8,0

Tris 54,0 g
Borsäure 27,5 g
0,5 M EDTA 20 ml
H₂O ad 1000 ml

0,5 M EDTA-Lösung, pH 8,0

0,5 M EDTA-Na₂ 93,0 g
H₂O ad 500 ml

Die Lösungen wurden nach Bedarf unter Einstellung des pH-Wertes durch Hinzufügen von 15%iger Salzsäure-Lösung mit Wasser verdünnt. Der TBE-Puffer wurde beispielsweise für die Gelelektrophorese um einen Faktor 5 verdünnt.

10 mM Tris-Puffer

Tris 1,21 g
H₂O ad 1000 ml

Auftragspuffer

Glycerin 3,0 ml
H₂O 7,0 ml
Bromphenolblau 25 mg
Xylencyanol 25 mg

DNA-Molekulargewichtsmarker

Marker VIII 0,2 ml
Tris-Puffer 1,8 ml

3. Methoden

3.1. Isolierung der DNA

Die Extraktion der DNA wurde nicht von mir durchgeführt, da sämtliche Proben der Patientenkollektive im Gefrierschrank einsatzbereit zur Verfügung standen.

Zur Isolierung der DNA aus dem Patientenblut wurde ein Extraktionsroboter eingesetzt. Anschließend wurde die DNA-Konzentration mit Hilfe der Agarosegelelektrophorese bestimmt. Die Agarosegele wurden mit einer 3%igen Agarose-Konzentration hergestellt. Zur Überprüfung und Einstellung der DNA-Konzentration wurde ein DNA-Standard mit einer Konzentration von 25ng/µl aufgetragen.

3.2. Primer-Design

Unter Primern versteht man künstlich hergestellte Oligonukleotide, die komplementär zur Basenfolge des kodierenden DNA-Strangs (F-Primer) beziehungsweise zur Basenfolge des nichtkodierenden DNA-Strangs sind. Diese können an die denaturierten DNA-Stränge binden, einen partiellen Doppelstrang bilden und als Ansatzpunkt für die Polymerase dienen.

Das Primer-Design wurde nicht von mir durchgeführt, da bereits für alle 16 Exons geeignete Primer-Stammlösungen mit einer Konzentration von 50 pmol/µl im Tiefkühlschrank zur Verfügung standen. Diese wurden von mir durch Verdünnung um den Faktor zehn in die jeweilige Arbeitslösung mit einer Konzentration von 5 pmol/µl überführt.

Die vorliegenden Primer-Stammlösungen wurden von der Firma BioTeZ hergestellt. Die Sequenz, die Schmelztemperatur, der GC-Gehalt sowie die Fragmentlängen der verwendeten Primer sind in Tabelle 1 dargestellt.

Name des Primers	Sequenz (5' => 3')	T _{Schmelz} [°C]	GC-Gehalt [%]	Fragmentlänge [bp]
NCAD 1F NCAD 1R	TGGAAACTGCCTGGAGCCGTT GGACCGCCGCGTACCTGAAG	66 68	57 70	197
NCAD 2F NCAD 2R	TCTCAGTTGAAGGAGGTAGCA CATGAGCATGGACACTGCATG	62 64	48 52	219
NCAD 3F NCAD 3R	TAACCTAAGCAGGATATAGG GTGGTCTGAAGCAAAGCATA	56 58	40 45	405
NCAD 4F NCAD 4R	ATGTGTTTCCTAGTACTCAGG CATACATTTGTCTTGTGGTATG	60 60	43 36	241

NCAD 5F	TGAGCTCATTTAGTCTCTCAC	60	43	262
NCAD 5R	CTCTGCAGACATTTAGAACTG	60	43	
NCAD 6F	CTTCTCACAGACATAAATCTG	58	38	251
NCAD 6R	TGGTTACACCATACTTTCCT	56	40	
NCAD 7F	CTGGAATGAAGGGTAACCAT	58	45	284
NCAD 7R	GTGATATGATATTGTGCACCT	58	38	
NCAD 8F	GAGCCGTTTACAGAACAACCTG	62	48	278
NCAD 8R	TGACCAACCTTCTCAGTAACG	62	48	
NCAD 9F	GTTGTCCTTCAGTGGTCCAT	60	50	296
NCAD 9R	TATTGGTCCTTGCTGAGCAG	60	50	
NCAD 10F	CTACAGAATGCAAGCATTCT	56	40	367
NCAD 10R	GCACAGCATAGAACATAAGT	56	40	
NCAD 11F	GAGCCAGTTGCATTTGGAACCT	62	48	290
NCAD 11R	GCATGCATGATGAGGATCTAC	62	48	
NCAD 12F	GAGGCTCATTGGAGAGAACCT	60	50	331
NCAD 12R	CTCTCAACTGCACATATATTCA	60	36	
NCAD 13F	CATCCTGAACAATGCTATGTG	60	43	366
NCAD 13R	TGAACATCCTAGAAGCCAAGA	60	43	
NCAD 14F	CTGTGACTAAATAGGCCAGG	60	50	311
NCAD 14R	AGGAGGGAAACCTGATACCA	60	50	
NCAD 15F	TCTATCTTTGTGCCCATCTCC	62	48	292
NCAD 15R	GCAATTTGTGGCCTACAGAGA	62	48	
NCAD 16F	CATTAGGATCTGCTTGTGGT	58	45	362
NCAD 16R	AGCCTAGCTTCTGAATGCTT	58	45	

Tabelle 1: Primerpaare der N-Cadherin Exons

Sämtliche Sequenzen sind in 5'-3'-Richtung angegeben. Die Abkürzung NCAD steht für das Protein N-Cadherin. Die Zahl gibt das Exon an und das „F“ bzw. „R“ steht für Vorwärtsprimer (Forward; „F“) bzw. Rückwärtsprimer (Reverse; „R“).

Die Schmelztemperatur berechnet sich nach folgender Formel:

$$TM = 2^{\circ}\text{C} \times (A + T) + 4^{\circ}\text{C} \times (G + C)$$

Für jedes Exon wird je ein Vorwärts- und ein Rückwärtsprimer benötigt, welche anhand einer Referenzsequenz beispielsweise mit Hilfe des Programms Oligo oder Primer3 designed werden können. Um Primer zu designen, muss die Sequenz des zu untersuchenden DNA-Abschnittes bekannt sein. Bei der Auswahl sollten die folgenden Kriterien eingehalten werden. Die Primer eines Exons sollten möglichst ähnliche Schmelztemperaturen besitzen, der GC-Gehalt sollte bei 50% liegen und die Länge etwa 20 bp betragen. Desweiteren sollten die Primer im Intron-Bereich liegen und einen Abstand von etwa 60 bp zum Beginn bzw. Ende des Exons besitzen. Die maximale Fragmentgröße sollte bei etwa 400 bp liegen.

3.3. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR ist eine einfache und weit verbreitete Methode um DNA-Proben in kürzester Zeit millionenfach zu vervielfältigen. Dabei wird als Enzym eine DNA-Polymerase verwendet, welche die komplementären Stränge in sich wiederholenden Zyklen an die DNA-Proben der Patienten synthetisiert. Die zyklische Erwärmung und Abkühlung wurde in dieser Arbeit in Thermocyclern durchgeführt. Um die hohen Temperaturen von über 90°C zu ermöglichen, ohne in jedem Zyklus neue Polymerase hinzufügen zu müssen, wurde hitzestabile DNA-Polymerase aus dem thermophilen Bakterium *Thermus Aquaticus* (Taq) verwendet.

Die sich dabei immer wiederholenden Schritte sind die Denaturierung bei 94°C, bei der sich die Doppelstränge der DNA voneinander lösen. Schnelles Abkühlen bis auf die Annealingtemperatur (T_{AN}) des jeweiligen Primers führt dazu, dass sich die Primer an die DNA anlagern, ohne dass sich die Doppelstränge wieder miteinander verbinden. Danach wird die Temperatur wieder auf 72°C angehoben, da in diesem Bereich das Temperaturoptimum der verwendeten Taq-DNA-Polymerase liegt. Die Polymerase knüpft bei diesem Schritt jeweils die entsprechende komplementäre Base an den Primer und an das Template, wodurch es zu einer Strangverlängerung kommt. Ist diese weit genug fortgeschritten, wird dieser neu synthetisierte Strang wieder durch Denaturierung von seiner Matrize gelöst und der Zyklus beginnt erneut. Durch Abkühlen auf Temperaturen unter 10°C wird der Prozess gestoppt. Nach etwa 25 bis 45 Zyklen hat man durch die annähernd exponentielle Vermehrung der DNA meist eine ausreichende Menge gewonnen um diese beispielsweise zur Sequenzierung zu nutzen. In dieser Arbeit wurde die Taq-DNA-Polymerase mit einer Aktivität von 5 U/μl benutzt. Zur Schaffung eines geeigneten Milieus für die Taq-DNA-Polymerase wurden 10x PCR-Puffer und Magnesiumchlorid-Lösung verwendet. Der PCR-Puffer enthielt 100 mM Tris-HCl (pH 8,3) und 500 mM KCl. Die Magnesiumchlorid-Lösung hatte eine Konzentration von 25 mM. Zusätzlich wurden die entsprechenden Primer, Desoxyribonukleotide (dNTPs) und Wasser hinzugefügt.

Elektrophoresegele

Zur Kontrolle der Reaktionsprodukte der PCR wurde die Agarosegel-Elektrophorese eingesetzt. Dazu wurde die Agarose in 1x TBE-Puffer gelöst und in der Mikrowelle aufgekocht. Anschließend wurde Ethidiumbromid hinzugefügt und in eine Gelkammer ge-

gossen. Die Polymerisation der Gele dauerte bei Raumtemperatur etwa 60 Minuten.

3% Agarosegel	klein	Groß
Agarose	0,6 g	3,0 g
1x TBE-Puffer	20 ml	100 ml
Ethidiumbromid	1,0 µl	5,0 µl

PCR-Optimierung

Eine Optimierung der PCR wurde bei allen 16 Exons durchgeführt. Dabei wurden die Annealingtemperatur, die Zyklenzahl, die Menge an eingesetzten Primern, genomischer DNA und PCR-Additiven (z. B. Betaine, DMSO) optimiert um die Zahl unerwünschter Nebenprodukte auf ein Minimum zu reduzieren und ausreichend PCR-Produkt zu erhalten. Das angesetzte Reaktionsgemisch für die PCR ist in Tabelle 2 dargestellt.

Lösung	Konzentration	Menge (µl)
Wasser	100%	17,4
PCR-Puffer	10x	2,5
MgCl ₂	25 mM	1,5
Primer F	5 pmol/µl	1,0
Primer R	5 pmol/µl	1,0
dNTP-Mix	20 mmol/µl	0,3
Taq-Polymerase	5 U/µl	0,3
genomische DNA	ca. 25 ng/µl	1,0

Tabelle 2: Reaktionsgemisch für PCR

Bei der Optimierung wurden Gradienten-Thermocycler der Firmen Biometra und MJ Research eingesetzt. Mit diesen gelingt es, während einer PCR gleichzeitig zwölf verschiedene Annealingtemperaturen auf zwölf verschiedene Proben wirken zu lassen. Dabei wurde als Temperaturspanne ein Bereich von 50°C bis 70°C gewählt. Für die PCR wurde das Programm aus Tabelle 4 verwendet. Die Annealingtemperatur wurde aus der optischen Auswertung der Gelelektrophorese bestimmt. Dabei wurde die Temperatur ausgewählt, die das deutlichste PCR-Produkt lieferte. Die Temperaturen an den verschiedenen Probenpositionen innerhalb der Cycler gibt Tabelle 3 wieder. Durch Vergleich der Ergebnisse diverser Versuche wurde die optimale Menge an Additiven und Zyklenzahlen ermittelt.

Cycler	Position im Gradientencycler											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Biometra	50,0	50,6	51,9	54,0	56,4	58,7	61,3	63,6	66,0	68,1	69,4	70,0
MJ-R	50,0	50,5	51,7	53,2	55,5	58,4	61,8	64,6	66,8	68,4	69,6	70,0

Tabelle 3: Gradiententabelle zur Bestimmung der Annealingtemperatur für die Cycler der Firmen Biometra und MJ-Research (MJ-R)

Stufe	Temperatur [°C]	Zeit [min]	Reaktion
1	94	10:00	Anfangsdenaturierung
2	94	0:30	Denaturierung
3	T _{AN}	0:30	Primerannealing
4	72	1:30	Primerextension
5	39x Wiederholung der Schritte 2-4		
6	72	5:00	abschließende Primerextension
7	4	∞	Kühlung

Tabelle 4: Grundprogramm der PCR

Durchführung der PCR

Die in Tabelle 2 angegebenen Lösungen wurden im Tiefkühlschrank gelagert und vor Benutzung in einem Heizblock aufgetaut, anschließend gemischt und zentrifugiert. Nur die Taq-Polymerase blieb möglichst lange im Tiefkühlschrank und wurde nicht in den Heizblock gestellt. Die optimierten Reaktionsansätze (Mastermixe) wurden in ausreichender Menge entsprechend der Anleitung in den Tabellen 5-7 angesetzt, gemischt und zentrifugiert – nur die genomische DNA wurde noch nicht dazu gegeben. Es wurden dann entsprechend 24 µl (bzw. 23,5 µl bei Exon 10) des Mastermixes in jede Reaktionskammer eines Multiply-Strips auf Eis pipettiert und diese jeweils mit 1 µl (bzw. 1,5 µl bei Exon 10) genomischer DNA versehen, gemischt und zentrifugiert.

Reagenz	Konzentration	Volumen [µl] 1x	Volumen [µl] 50x	Volumen [µl] 65x
Wasser	100%	17,4	870,0	1131,0
PCR-Puffer	10x	2,5	125,0	162,5
MgCl ₂	25 mM	1,5	75,0	97,5
NCAD F	5 pmol/µl	1,0	50,0	65,0
NCAD R	5 pmol/µl	1,0	50,0	65,0
dNTP-Mix	20 mmol/µl	0,3	15,0	19,5
Taq-Polymerase	5 U/µl	0,3	15,0	19,5
genomische DNA	25ng/µl	je 1,0	je 1,0	je 1,0

Tabelle 5: optimierter Reaktionsansatz mit Konzentrationsangaben für 50 und 65 Proben für die Primer der Exons 2-9, 11-16

Reagenz	Konzentration	Volumen [μ l] 1x	Volumen [μ l] 50x	Volumen [μ l] 65x
Wasser	100%	14,9	745,0	968,5
PCR-Puffer	10x	2,5	125,0	162,5
DMSO	100%	2,5	125,0	162,5
MgCl ₂	25 mM	1,5	75,0	97,5
NCAD F	5 pmol/ μ l	1,0	50,0	65,0
NCAD R	5 pmol/ μ l	1,0	50,0	65,0
dNTP-Mix	20 mmol/ μ l	0,3	15,0	19,5
Taq-Polymerase	5 U/ μ l	0,3	15,0	19,5
genomische DNA	25ng/ μ l	je 1,0	je 1,0	je 1,0

Tabelle 6: optimierter Reaktionsansatz mit Konzentrationsangaben für 50 und 65 Proben für die Primer des Exons 1

Reagenz	Konzentration	Volumen [μ l] 1x	Volumen [μ l] 50x	Volumen [μ l] 65x
Wasser	100%	9,6	480,0	624,0
PCR-Puffer	10x	2,5	125,0	162,5
Betaine	5M	2,0	100,0	130,0
MgCl ₂	25 mM	2,0	100,0	130,0
NCAD F	5 pmol/ μ l	3,0	150,0	195,0
NCAD R	5 pmol/ μ l	3,0	150,0	195,0
dNTP-Mix	20 mmol/ μ l	0,7	35,0	45,5
Taq-Polymerase	5 U/ μ l	0,7	35,0	45,5
genomische DNA	25ng/ μ l	je 1,5	je 1,5	je 1,5

Tabelle 7: optimierter Reaktionsansatz mit Konzentrationsangaben für 50 und 65 Proben für die Primer des Exons 10

Anschließend wurden die Proben in den Thermocycler gestellt und dieser mit dem entsprechenden Programm und der je nach Exon unterschiedlichen Annealingtemperatur gestartet. Das optimierte Cycler-Programm aller Exons ist in Tabelle 8 angegeben. Bei jeder PCR wurde eine nur aus dem Reaktionsansatz bestehende Negativ-Kontrolle (k_n) mitgeführt.

Stufe	Temperatur [°C]	Zeit [min]
1	94	10:00
2	94	0:30
3	T_{AN}	0:30
4	72	1:30
5	44x Wiederholung der Schritte 2-4	
6	72	5:00
7	4	∞

Tabelle 8: optimiertes Cyclex-Programm aller NCAD-Exons; die Annealingtemperatur variiert von Exon zu Exon

Kontrolle der Amplifikationsprodukte

Die Kontrolle des PCR-Ergebnisses erfolgte mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese. Die Agarosegele wurden wie oben beschrieben hergestellt und mit 1x TBE-Puffer bedeckt. Anschließend wurden 3 μ l der amplifizierten DNA aus der PCR mit 3 μ l Laufpuffer gemischt und auf das Gel aufgetragen. Als Vergleich für die Fragmentlängen wurde der DNA-Molekulargewichtsmarker VIII der Firma Fermentas (siehe Abschnitt 2.6.) mit Laufpuffer gemischt und aufgetragen. Durch Anlegen einer Spannung von 80 V wurden die Produkte innerhalb von 45 Minuten elektrophoretisch getrennt. Das Ethidiumbromid im Gel sorgt für die Sichtbarkeit der Banden bei UV-Bestrahlung, sodass sie in der UVstar-Fotokammer dargestellt und fotodokumentiert werden konnten um eine spätere Auswertung zu ermöglichen.

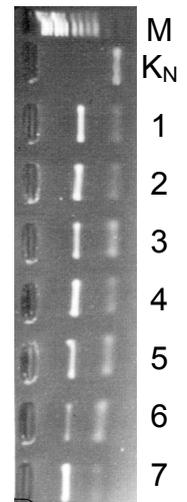


Abbildung 6: Agarosegel von Exon 1 zur Kontrolle der Amplifikationsprodukte. DNA-Molekulargewichtsmarker VIII (M), Negativkontrolle (K_N), DNA-Proben (1-7)

3.4. Sequenzierung

Die Sequenzierung ist eine einfache, weit verbreitete und sehr sensitive Methode zur Detektion von genetischen Varianten. Veränderungen der Basensequenz können damit sehr schnell und präzise aufgespürt werden. Das Prinzip entspricht der Kettenabbruchmethode von Sanger. Dabei wird wie bei der PCR ein Primer an die DNA gebunden und dieser Strang mit dNTPs verlängert. In geringerer Konzentration werden Didesoxyribonukleosid-Triphosphate (ddNTPs) hinzugegeben. Werden diese in den zu

polymerisierenden Strang eingebaut, so bricht die Polymerisationsreaktion ab, da keine Hydroxylgruppe am 3'-Ende verfügbar ist um die nächste Base anzufügen. Auf diese Weise entstehen zufallsbedingt unterschiedlich lange DNA-Fragmente. Durch das Cycle-Sequencing werden die Fragmente vermehrt, wodurch eine spätere Analyse vereinfacht wird. Im Unterschied zur PCR wird hierbei nur entweder ein F-Primer oder ein R-Primer hinzugegeben. Der Produktanstieg ist folglich nicht exponentiell wie bei der PCR.

Die vier verschiedenen ddNTPs sind mit je einem spezifischen Fluoreszenzfarbstoff markiert. Sie besitzen unterschiedliche Absorptionsmaxima und können somit nach elektrophoretischer Auftrennung zur automatischen Analyse herangezogen werden.

Base	Fluoreszenz-Farbe	Wellenlänge [nm]
C	Blau	531
A	Grün	560
G	Gelb	580
T	Rot	610

Tabelle 9: Angaben zu den ddNTPs im BigDye Terminator-Kit

Um die amplifizierten Proben sequenzieren zu können, durchlaufen diese vorher einige Zwischenschritte. Zuerst werden die Proben enzymatisch aufgereinigt, anschließend werden durch Cycle-Sequencing unter Zugabe von ddNTPs DNA-Fragmente unterschiedlicher Länge markiert. Zur Aufreinigung werden die Produkte durch eine Sephadexsäule zentrifugiert und anschließend im Sequencer analysiert. Danach stehen die Ergebnisse zur Analyse am Computer zur Verfügung.

Das bei uns verwendete Sequenzierungssystem ist ein ABI Prism 3100-Avant Genetic Analyzer. Dabei handelt es sich um ein mikroprozessorgesteuertes Elektrophorese- und Fluoreszenz-Detektionssystem. Über ein bewegliches Laser-Scanning-Detektionsmodul misst das Gerät die Fluoreszenz über die gesamte Gelbreite. Durch die Gelelektrophorese werden die Fragmente separiert und beim Ablesen durch den Argon-Ionen-Laser zur Fluoreszenz angeregt. Die Fluoreszenzen werden durch vier Filter geschickt, die jeweils im Bereich des Emissionsmaximums für die jeweilige Wellenlänge durchlässig sind. Dahinter wird das Licht dann in einer Photo-Multiplier-Röhre in elektrische Impulse umgewandelt und verstärkt. Die gemessene Stromstärke wird aufgezeichnet und steht als Datenmaterial zur Auswertung bereit.

Herstellung der zu sequenzierenden Proben

Die DNA-Proben werden, wie im Abschnitt II.1. beschrieben, amplifiziert und anschließend im Agarosegel überprüft. Nur Proben, die im Gel gut sichtbar und frei von Nebenbanden waren, wurden für die Sequenzierung verwendet.

Für die enzymatische Aufreinigung wurden die Exonuklease I (20 U/ μ l) und die Shrimp-Alkaline-Phosphatase (1 U/ μ l) zu den amplifizierten Proben gegeben (Reaktionsansatz in Tabelle 10). Die Proben wurden in einem Kühlblock pipettiert. Anschließend wurde der Ansatz 30 min bei 37°C und 15 min bei 72°C in einem Thermocycler inkubiert.

Reagenz	Volumen [μ l]	Volumen [μ l] 50x	Volumen [μ l] 65x
H ₂ O	2,59	129,50	168,35
Exonuclease I	0,09	4,50	5,85
Shrimp-Alkaline-Phosphatase	0,32	16,00	20,80
PCR-Produkt	je 7,00	je 7,00	je 7,00

Tabelle 10: Reaktionsansatz für die enzymatische Aufreinigung für 50 und 65 Proben

Cycle-Sequencing

Für die Sequenzierung wurde das BigDye Terminator-Kit v1.1 verwendet. Dieses besteht aus dem BigDye-Ready-Reaktion-Mix und dem 5x Sequenzierungspuffer. Außerdem wurden die entsprechenden Forward- bzw. Reverse-Primer sowie die PCR-Produkte und Wasser benötigt.

In den Produktinformationen des Herstellers werden folgende Inhaltsstoffe angegeben: A-, C-, G- und T-Dye Terminator, dATP, dCTP, dGTP, dTTP, Magnesiumchlorid, Tris-HCl (pH 9,0), hitzeresistente Pyrophosphatase und AmpliTaq-DNA-Polymerase. Weitere Angaben zu Konzentrationen, Aktivität und pH-Wert wurden nicht gemacht.

Aus den bei Raumtemperatur aufgetauten Reagenzien wurde ein Mastermix entweder als Forward- oder als Reverse-Ansatz hergestellt (siehe Tabelle 11). Der Mastermix wurde gemischt, zentrifugiert und in Tube-Strips pipettiert. Nach Zugabe der aufgereinigten DNA wurden die Tube-Strips erneut gemischt, zentrifugiert und im Thermocycler entsprechend dem in Tabelle 12 abgebildeten Programm inkubiert. Tabelle 11 zeigt den Ansatz für 50 Proben.

Reagenz	Volumen [μ l]	Volumen [μ l] 50x	Volumen [μ l] 65x
Wasser	4,75	237,50	308,75
5x Sequenzierungspuffer	1,75	87,50	113,75
F- oder R-Primer	1,00	50,00	65,00
BigDye Ready Reaction Mix	0,50	25,00	32,50
PCR-Produkt	je 2,0	je 2,0	je 2,0

Mastermix

Tabelle 11: Ansatz für das Cycle-Sequencing für 50 und 65 Proben

Schritt	Temperatur [$^{\circ}$ C]	Zeit [min.]	Reaktion
1	96	1:00	Anfangsdenaturierung
2	96	0:10	zyklische Denaturierung
3	50	0:30	Primerannealing
4	60	4:00	Primerextension
25x Wiederholung der Schritte 2-4			
5	4	∞	Kühlung

Tabelle 12: Programm für das Cycle-Sequencing

Sephadex-Aufreinigung

Die Sephadex-Aufreinigung erfolgte in einer Millipore 96-Loch-Filterplatte. Der Boden dieser Platte wurde von einer Durapore-Filtermembran mit einer Porengröße von 0,45 μ m gebildet. Diese Platte ließ sich genau auf die 96-Loch Sequenzier-Platte stellen.

Diese Millipore 96-Loch-Filterplatte wurde mit einer Einfüllhilfe mit Sephadex G-50 und jeweils 300 μ l Wasser je Loch befüllt und über Nacht zum Quellen im Kühlschrank gelagert.

Nach 24 Stunden wurde die Platte 5 min bei 970 g zentrifugiert. Zum Waschen wurden erneut 150 μ l Wasser je Loch dazu gegeben und wieder 5 min bei 970 g zentrifugiert. Anschließend wurde die Sequenzierplatte in jedem Loch mit 13 μ l Formamid befüllt und unter die Millipore-Platte gestellt. Auf das Sephadexgel wurden 10 μ l Cycle-Sequencing-Produkt pipettiert. Nach erneuter Zentrifugation für 5 min bei 970 g waren die Fragmente fertig aufgereinigt und zum Sequenzieren bereit.

Sequenzierung

Die Sequenzierung erfolgte in einem Prism 3100 Avant-Genetic-Analyser von Applied Biosystems. Die daraus entstandenen Daten wurden mit Hilfe der Software Sequencher™ Version 4.1.2 (Gene Codes Corporation © 1991-2000) ausgewertet. Zur Aus-

wertung wurde eine Referenzsequenz für das N-Cadherin-Gen benötigt. Die für diese Arbeit gewählte Referenzsequenz ENSG00000170558, auf die sich die Nummerierung in dieser Arbeit bezieht, stammte von der Genom-Datenbank Ensembl (Ensembl 2012). Die Sequenzen wurden analysiert und Auffälligkeiten dokumentiert. Anschließend wurden die Auffälligkeiten im Chromatogramm markiert und weiter untersucht.

Nach Auffinden einer Veränderung der Basensequenz im Vergleich zur Referenz ist abzuklären, ob die Änderung der Basenfolge auch zu einer Änderung der Aminosäuresequenz im Protein führt. Auf Grund des degenerierten genetischen Codes codieren mehrere Basentriplets für die gleiche Aminosäure. Wird eine Base ausgetauscht, ohne dass sich die Aminosäuresequenz des Proteins ändert, so wird dies wahrscheinlich keinen Einfluss auf die Proteinstruktur haben. Man spricht in diesem Fall von einer stillen oder stummen Mutation.

3.5. Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismen-Analyse

Restriktionsenzyme sind hochspezifische bakterielle Endonukleasen, welche die DNA an genau definierten Erkennungssequenzen zerschneiden. Verändert sich die Erkennungssequenz beispielsweise durch einen Basenaustausch, eine Deletion oder Insertion, so kann es sein, dass die Sequenz durch ein Enzym nicht mehr erkannt oder gerade durch diese Änderung erkannt wird. Durch einen Restriktionsverdau ändert sich somit die Anzahl der Banden auf einem Gel, sofern eine Veränderung der Sequenz im Bereich der Erkennungsstelle vorliegt. Aus der Größe der entstandenen Fragmente lässt sich zur Kontrolle die Schnittstelle abschätzen. Somit können SNPs durch Auswahl des richtigen Restriktionsenzym sehr einfach und kostengünstig nachgewiesen werden und auch große Patientenkollektive (beispielsweise bei der Frequenzbestimmung) können schnell analysiert werden.

Die dazu benötigten Restriktionsendonukleasen können anhand einer „Cut-Map“ bestimmt werden. In dieser Arbeit wurden die Enzyme mit Hilfe der Software Sequencher™ ausgewählt. Für die unbekannte Variante Asn357Ile (Patient H28) im Patientenkollektiv der HCM-Patienten wurden die Enzyme in Tabelle 13 als mögliche Restriktionsenzyme ermittelt.

Exon	Patient	Lokalisation	Restriktionsenzyme	
			Wildtyp	Variante
8	H28	Asn357Ile	-	BsmI BsaMI Asp700I XmnI

Tabelle 13: mögliche Restriktionsenzyme im Bereich der unbekanntenen Variante

Die gefundenen Enzyme besitzen keine Erkennungssequenz in der Wildtypsequenz, allerdings wird die Sequenz der Variante von den vier in Tabelle 13 genannten Enzymen erkannt. Dies ermöglicht eine Unterscheidung der Patienten mit der Variante von den Patienten mit der Wildtypsequenz.

In dieser Arbeit fand das Restriktionsenzym BsmI (Patient H28) Verwendung, welches aus *Bacillus stearothermophilus* (BsmI) isoliert wurde.

Restriktionsenzym	Sequenz im Erkennungsbereich		
	Enzym	Wildtyp	Mutation
BsmI	5'...NG AATGC...3' 3'...N CTTACG...5'	5'...GCAATC C...3' 3'...CGTTA GG...5'	5'...GCATTC C...3' 3'...CGTAA GG...5'

Tabelle 14: Restriktionsenzym BsmI mit Erkennungssequenz

Die Komponenten wurden entsprechend den Vorgaben des Herstellers (Tabelle 15) verwendet. Zu 7 µl des Mastermixes aus Wasser, NEBuffer 4 und dem Restriktionsenzym BsmI, wurden 3 µl PCR-Produkt zugefügt, vermischt und zentrifugiert.

Reagenz	Volumen [µl]	Volumen [µl] 65x
H ₂ O	5,6	728,0
NEBuffer 4 (10x)	1,0	65,0
BsmI (5.000U/ml)	0,4	26,0
PCR-Produkt	je 3,0	je 3,0

Tabelle 15: Reaktionsansatz für RFLP-Analyse mit BsmI für 65 Proben

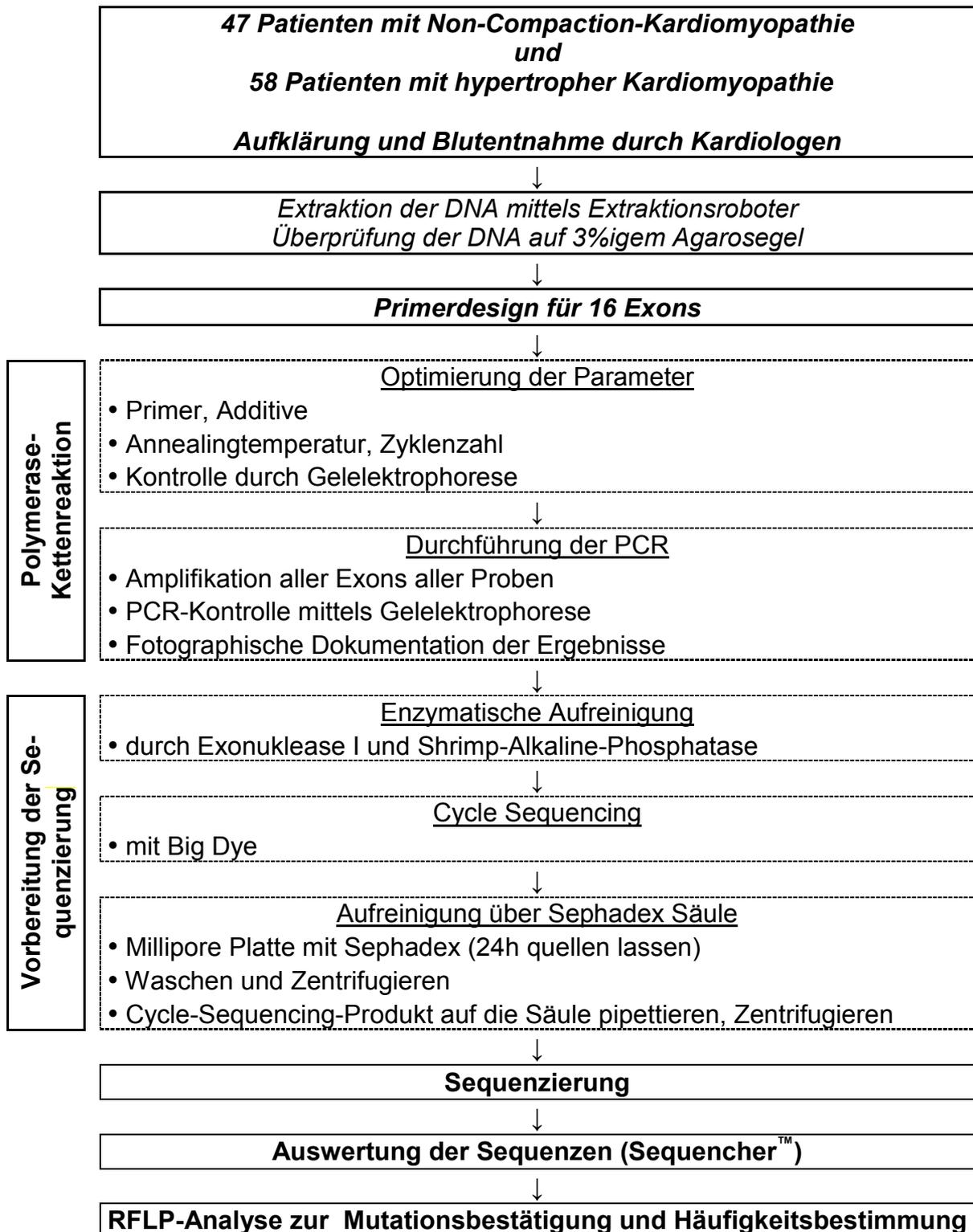
Darauf folgte die Inkubation der Proben bei 65 °C für 2 h in einem Thermocycler.

NEBuffer 4 (10x)

50 mM Kaliumacetat
20 mM Tris-Acetat
10 mM Magnesiumacetat
1 mM Dithiothreitol

Die Proben wurden zur Kontrolle auf ein 3%iges Agarosegel aufgetragen. Dabei wurden die 10 µl Probenvolumen mit 3 µl Auftragspuffer vermischt. Die Fragmente der jeweiligen Proben mit Variationen wurden auf jedem Gel zweimal mitgeführt. Die anderen Proben wurden jeweils einmal aufgetragen. Zusätzlich wurde der DNA-Molekulargewichtsmarker VIII und ein unbehandeltes PCR-Produkt der auffälligen Probe mitgeführt. Das Ergebnis der Gelelektrophorese wurde anschließend fotografisch dokumentiert und ausgewertet.

Fließschema zum Arbeitsablauf



*Arbeiten, die nicht von mir durchgeführt wurden
Arbeiten, die von mir durchgeführt wurden*

III. Ergebnisse

Es werden nun die Ergebnisse der Optimierung und Durchführung der PCR sowie der Sequenzierung dargestellt. Mit Hilfe der RFLP-Analyse wurde das Kollektiv der gesunden Kontrollpatienten nach der Mutation (Asn357Ile) in Exon 8 gescreent. Die Ergebnisse werden im Anschluss dargelegt.

1. PCR-Optimierung und -Durchführung

Zur Optimierung der PCR wurde DNA von anonymen Blutspendern verwendet. Diese wurden zur Optimierung der Annealingtemperatur in je zwölf gleichen Ansätzen in einen Gradienten-Cycler gegeben. Dort durchliefen sie das in Tabelle 4 angegebene Cyclerprogramm mit einer aus der Tabelle 3 zu entnehmenden Annealingtemperatur für die jeweilige Probe (Bereich 50-70°C). Alle 16 Primerpaare konnten erfolgreich optimiert werden. Die optimierten Annealingtemperaturen für die Primerpaare sind in Tabelle 16 dargestellt. Die genauen methodischen Angaben sind im Methodenteil unter Abschnitt II.3.3. zu finden.

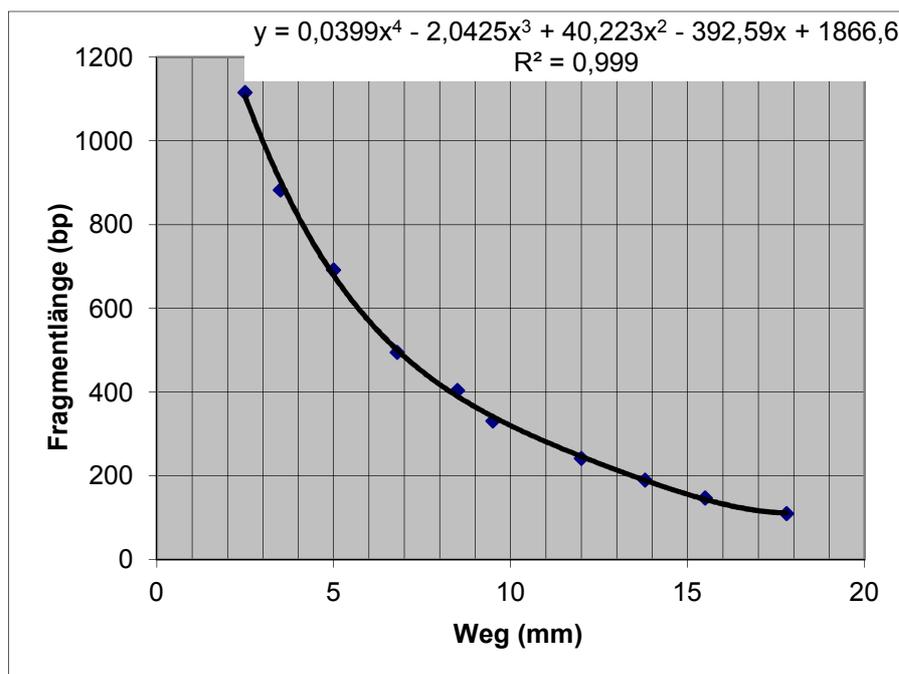
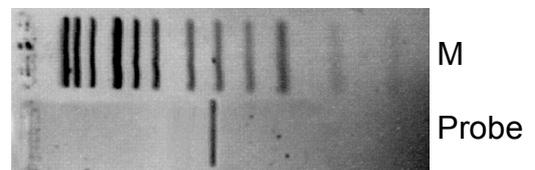
Exon	Annealingtemperatur [°C]	Ansatz
1	62	Tab. 6 (DMSO)
2	62	Tab. 5 (S)
3	58	Tab. 5 (S)
4	58	Tab. 5 (S)
5	52	Tab. 5 (S)
6	58	Tab. 5 (S)
7	51	Tab. 5 (S)
8	65	Tab. 5 (S)
9	62	Tab. 5 (S)
10	59	Tab. 7 (Betaine)
11	56	Tab. 5 (S)
12	62	Tab. 5 (S)
13	52	Tab. 5 (S)
14	53	Tab. 5 (S)
15	58	Tab. 5 (S)
16	53	Tab. 5 (S)

Tabelle 16: Ergebnisse der Optimierung der NCAD-Primerpaare; die Komponenten des optimierten PCR-Ansatzes sind in den unter „Ansatz“ angegebenen Tabellen zu finden. Das optimierte Cycler-Programm ist in Tabelle 8 dargestellt.

Alle 16 Exons der 47 Patienten mit NC und der 58 Patienten mit HCM konnten erfolgreich amplifiziert werden. Der Begriff „erfolgreich“ beschreibt in diesem Fall das Auftreten einer sauberen Bande bei der Gelelektrophorese im Bereich der erwarteten Fragmentlänge des jeweiligen Exons.

Um die Fragmentlänge der amplifizierten Proben im Gel überprüfen zu können, wurde eine Eichkurve des DNA-Molekulargewichtsmarkers VIII erstellt (siehe Diagramm 1).

Abbildung 7: 3%iges Agarosegel zur Kontrolle der Fragmentlänge (Exon 1) mit Marker



Fragmentlänge (bp)	Weg (mm)
110	17,8
147	15,5
190	13,8
242	12,0
331	9,5
404	8,5
495	6,8
692	5,0
883	3,5
1116	2,5

Diagramm 1: Eichkurve für den DNA-Molekulargewichtsmarker VIII

Die Eichkurve kann durch das im Diagramm angegebene Polynom vierten Grades ausreichend genau beschrieben werden (Korrelationskoeffizient 99,9%). Hierbei steht das x für den Weg in mm, den das Fragment während der Gelelektrophorese zurückgelegt hat und y für die Fragmentlänge in Basenpaaren.

Der Abstand zwischen Primer und Beginn von Exon 1 betrug beim F-Primer 102 Basen, der R-Primer lag 50 Basen hinter dem Exonende. Das ergibt eine Fragmentlänge von 197 bp.

Die Laufstrecke des Fragments von Exon 1 in Abbildung 7 beträgt etwa 13,5 mm (auf dem Originalausdruck). Setzt man die gemessene Strecke in das Polynom aus Diagramm 1 ein, so erhält man rechnerisch eine Fragmentlänge von etwa 197,24 bp. Das erzeugte Produkt liegt im erwarteten Größenbereich, sodass mit hoher Wahrscheinlichkeit das Exon 1 mit Intronregion und 5'-UTR amplifiziert wurde.

Anschließend wurden die Proben der HCM- und der NC-Platte aller N-Cadherin-Exons amplifiziert. Sie lieferten eindeutige, der Fragmentgröße entsprechend positionierte Banden.

2. Sequenzierung

Die anschließende Sequenzierung der N-Cadherin-Proben aller Exons diente der Suche nach Veränderungen in der genetischen Sequenz. Die Sequenzen wurden gespeichert und mit der SequencherTM-Software Version 4.1.2 gegen die Referenzsequenz ENSG00000170558 ausgewertet.

Als SNPs (Single Nucleotide Polymorphism) werden Variationen einzelner Basenpaare bezeichnet, die häufig in einem Patientenkollektiv auftreten. In der Genom-Datenbank Ensembl (Ensembl 2012) können die bereits beschriebenen Varianten mit der zugehörigen Identifikationsnummer aus der SNP-Datenbank (dbSNP 2012) eingesehen werden.

Da die Referenzsequenz nur einen Buchstabencode und kein Chromatogramm aufweist, dienen in dieser Arbeit im Weiteren Sequenzen von Patienten mit einem Chromatogramm, welches der Referenzsequenz entspricht, als visueller Vergleich.

Die Nomenklatur von Varianten wird ausführlich auf der Website der Human Genome Variation Society (HGVS 2012) beschrieben.

2.1. Ergebnisse der Sequenzierung der NC-Patienten

Insgesamt wurden bei der Sequenzierung der NC-Patienten drei synonyme SNPs und drei Varianten im Intronbereich nachgewiesen.

Es zeigten sich drei bekannte synonyme SNPs in den Exons 10, 13 und 15. Der SNP in Exon 10 (c.1431C>G) trat bei allen NC-Patienten homozygot auf und ist in den Datenbanken des National Center for Biotechnology Information (NCBI) unter rs1628684 verzeichnet. Es erfolgte ein Basenaustausch im Codon 477 von CCC zu CCG (Pro477Pro). Der SNP in Exon 13 (c.2091T>C) trat auch bei allen NC-Patienten homozygot auf und ist unter rs1220144 verzeichnet. Es erfolgte ein Basenaustausch im Codon 697 von CGT zu CGC (Arg697Arg). Der SNP in Exon 15 (c.2448C>T) trat bei 45% der NC-Patienten heterozygot und bei 11% homozygot auf. Er ist unter rs1041985 verzeichnet. Es erfolgte ein Basenaustausch im Codon 816 von GCC zu GCT (Ala816Ala). Exemplarisch wird der SNP in Exon 15 Ala816Ala in Abbildung 8 dargestellt.

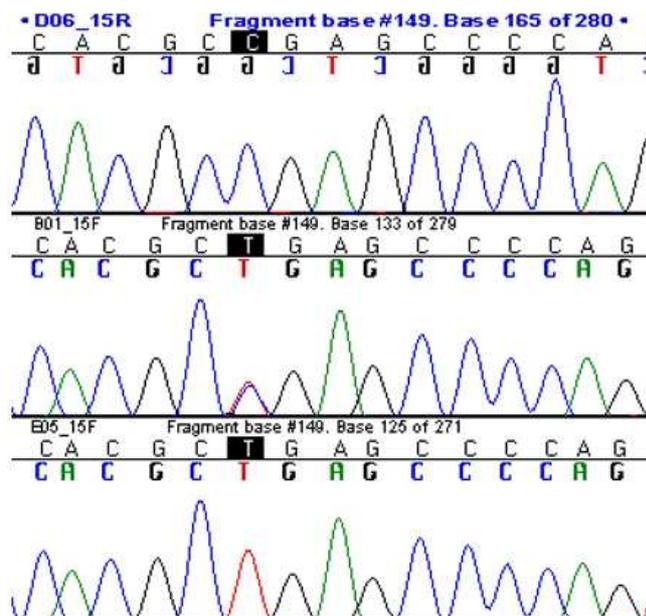


Abbildung 8: Ausschnitt der Sequenz mit der Variante in Exon 15. Probe D06 (Patient N01) dient als Referenzsequenz, Probe B01 (Patient N02) zeigt die heterozygote Variante, E05 (Patient N37) zeigt die homozygote Variante. Die zu betrachtenden Basen sind schwarz hinterlegt.

Desweiteren wurde ein bekannter SNP (c.1-62T>G) in der Intronsequenz 62 Basen vor Exon 1 gefunden, der bei 55% aller NC-Patienten heterozygot und bei einem Patienten homozygot auftrat.

In der Intronsequenz wurde bei einem der HCM-Patienten eine heterozygote Deletion der Basen 41 bis 36 vor Exon 1 beobachtet (c.1-41_36del).

Ein unbekannter SNP (c.2349+77G>A) in der Intronsequenz hinter Exon 14 und trat in 17% der HCM-Proben homozygot und in 47% heterozygot auf.

Zusammenfassung der Ergebnisse der NC-Patienten

Exon	Variante	Triplett	SNP DB	AS-Austausch	Häufigkeit	s/ns SNP
	c.-62T>G	-----	-----	-----	55% □, 1x ■	-----
	c.-41_36del	-----	unbekannt	-----	1x □	-----
10	c.1431C>G	CCC/G	rs1628684	Pro477Pro	100% ■	sSNP
13	c.2091T>C	CGT/C	rs1220144	Arg697Arg	100% ■	sSNP
	c.2349+77G>A	-----	unbekannt	-----	47% □, 17% ■	-----
15	c.2448C>T	GCC/T	rs1041985	Ala816Ala	45% □, 11% ■	sSNP

Tabelle 17: Ergebnisse der Sequenzierung des N-Cadherin-Gens aller NC-Patienten. SNPs in Intron-Sequenzen (grau), sSNPs (grün); heterozygot (□), homozygot (■)

2.2. Ergebnisse der Sequenzierung der HCM-Patienten

Insgesamt wurden bei der Sequenzierung der HCM-Patienten zwei mögliche Mutationen, vier nichtsynonyme SNPs, sechs synonyme SNPs und acht SNPs in Intronsequenzen nachgewiesen.

Nachgewiesene bekannte Varianten

Bei der Sequenzierung der Patienten mit HCM zeigten sich zwei bekannte nichtsynonyme SNPs in den Exons 3 und 16. Der SNP in Exon 3 (c.352G>A) trat bei drei der HCM-Patienten heterozygot auf und ist unter rs17445840 verzeichnet. Es erfolgte ein Basenaustausch im Codon 118 von GCA zu ACA (Ala118Thr). Der SNP in Exon 16 (c.2534A>G) trat bei zwei der HCM-Patienten heterozygot auf und ist unter rs2289664 verzeichnet. Es erfolgte ein Basenaustausch im Codon 845 von AAT zu AGT (Asn845Ser). Exemplarisch wird der SNP in Exon 3 in Abbildung 9 dargestellt.

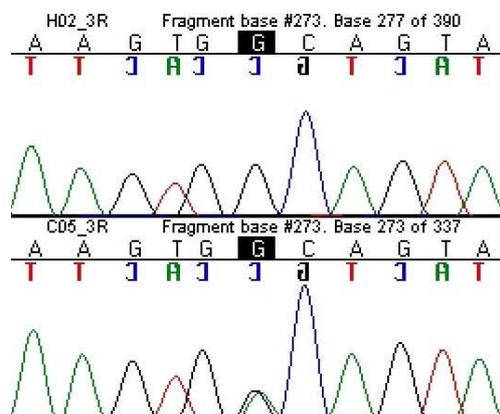


Abbildung 9: Ausschnitt der Sequenz mit der Variante in Exon 3. Probe H02 (Patient H13) dient als Referenzsequenz, Probe C05 (Patient H31) zeigt die heterozygote Variante.

Außerdem wurden vier bekannte synonyme SNPs in den Exons 3, 10, 13 und 15 gefunden. Der SNP in Exon 3 (c.332C>G) trat bei drei der HCM-Patienten heterozygot auf und ist unter rs41274322 verzeichnet. Es erfolgte ein Basenaustausch im Codon 111 von ACC zu ACG (Thr111Thr). Der SNP in Exon 10 (c.1431C>G) trat bei allen HCM-Patienten homozygot auf und ist unter rs1628684 verzeichnet. Es erfolgte ein Basenaustausch im Codon 477 von CCC zu CCG (Pro477Pro). Der SNP in Exon 13 (c.2091T>C) trat auch bei allen HCM-Patienten homozygot auf und ist unter rs1220144 verzeichnet. Es erfolgte ein Basenaustausch im Codon 697 von CGT zu CGC (Arg697Arg). Der SNP in Exon 15 (c.2448C>T) trat bei 45% der HCM-Patienten heterozygot sowie bei drei HCM-Patienten homozygot auf und ist unter rs1041985 verzeichnet. Es erfolgte ein Basenaustausch im Codon 816 von GCC zu GCT (Ala816Ala). Exemplarisch wird der SNP Ala816Ala in Exon 15 in Abbildung 10 dargestellt.

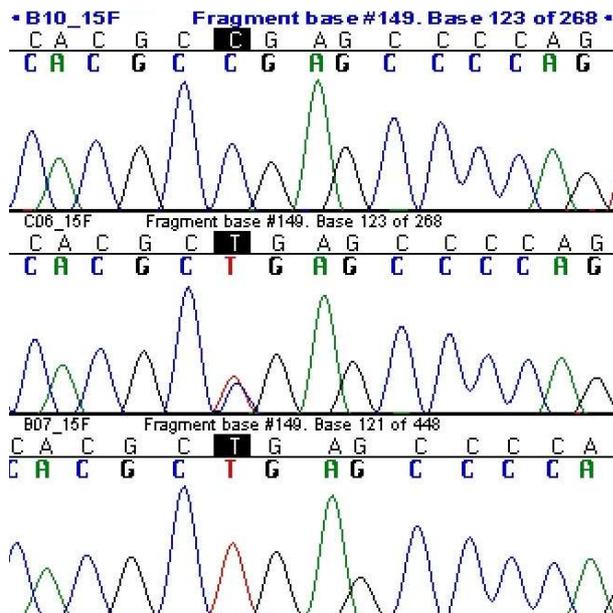


Abbildung 10: Ausschnitt der Sequenz mit der Variante in Exon 15. Probe B07 (Patient H44) dient als Referenzsequenz, Probe C06 (Patient H37) zeigt die heterozygote Variante, B10 (Patient H44) zeigt die homozygote Variante.

Desweiteren wurden zwei bekannte SNPs in Intronsequenzen gefunden. Es konnte ein heterozygoter Basenaustausch (c.1-62T>G) in der Intronsequenz vor Exon 1 nachgewiesen werden, welcher bei 30% der HCM-Patienten auftrat. Der zweite heterozygote Basenaustausch (c.2721*37C>T) war im Intronbereich hinter Exon 16 lokalisiert und trat bei drei der HCM-Patienten auf.

Nachgewiesene unbekannte Varianten

Bei der Sequenzierung der Patienten mit HCM zeigten sich zwei unbekannte nichtsynonyme Varianten in den Exons 7 und 8, die jeweils nur bei einem Patienten auftauchten.

Die Variante in Exon 7 (c.938C>T) trat bei Probe H22 heterozygot auf. Es erfolgte ein Basenaustausch im Codon 313 von CCA zu TCA (Pro313Ser).

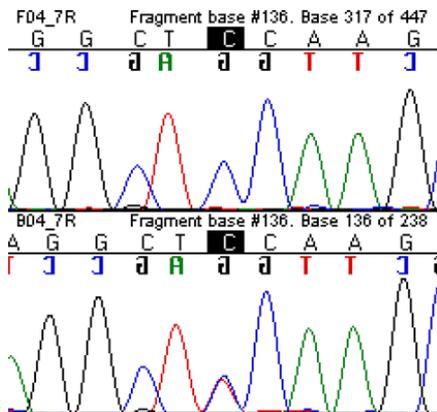


Abbildung 11: Ausschnitt der Sequenz mit der Variante in Exon 7. Probe F04 (Patient H26) dient als Referenzsequenz, Probe B04 (Patient H22) zeigt die nichtsynonyme heterozygote Variante.

Die Variante in Exon 8 (c.1070A>T) trat bei Probe H28 heterozygot auf. Es erfolgte ein Basenaustausch im Codon 357 von AAT zu ATT (Asn357Ile).

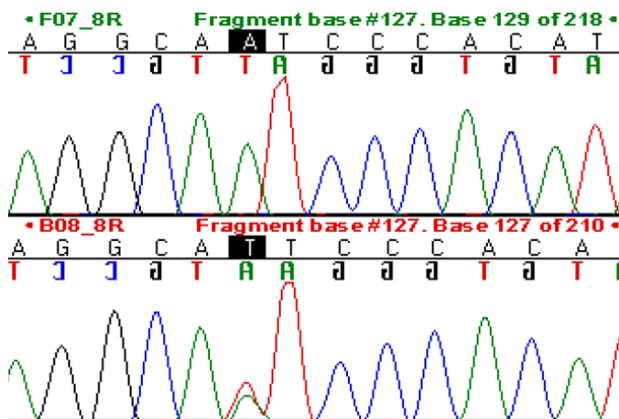


Abbildung 12: Ausschnitt der Sequenz mit der Variante in Exon 8. Probe F07 (Patient H45) dient als Referenzsequenz, Probe B08 (Patient H28) zeigt die nichtsynonyme heterozygote Variante.

Neben diesen jeweils nur einmal auftretenden nichtsynonymen Varianten zeigten sich noch zwei unbekannte nichtsynonyme SNPs in Exon 10, die häufiger auftraten. Der eine SNP (c.1433C>T) trat bei vier der HCM-Patienten heterozygot auf. Es erfolgte ein Basenaustausch im Codon 478 von CCT zu CTT (Pro478Leu).

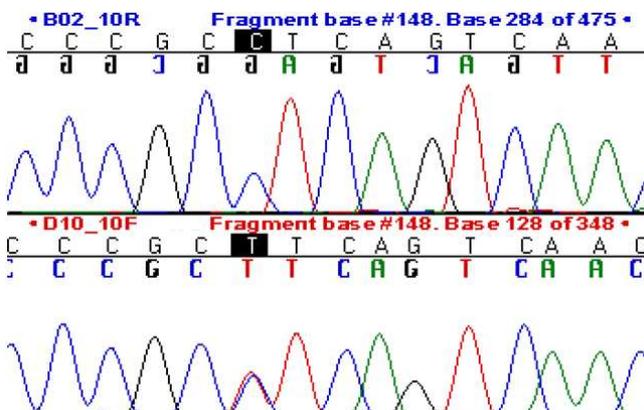


Abbildung 13: Ausschnitt der Sequenz mit der Variante in Exon 10. Probe B02 (Patient H08) dient als Referenzsequenz, Probe D10 (Patient H56) zeigt die nichtsynonyme heterozygote Variante.

Der zweite nichtsynonyme SNP (c.1495C>T) trat bei 23% der HCM-Patienten heterozygot und bei einem Patient homozygot auf. Es erfolgte ein Basenaustausch im Codon 499 von CCC zu TCC (Pro499Ser).

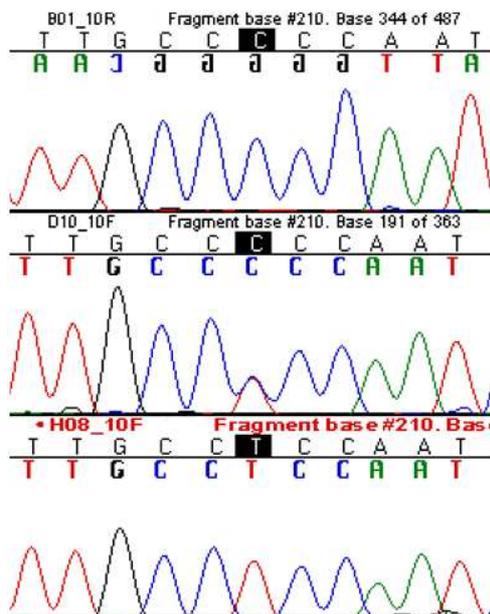


Abbildung 14: Ausschnitt der Sequenz mit der Variante in Exon 10. Probe B01 (Patient H01) dient als Referenzsequenz, Probe D10 (Patient H56) zeigt die nichtsynonyme heterozygote Variante, Probe H08 (Patient H53) zeigt die homozygote Variante.

Es wurden zwei unbekannte synonyme SNPs in den Exons 6 und 10 gefunden. Der SNP in Exon 6 (c.802T>C) trat bei einem der HCM-Patienten homozygot auf. Es erfolgte ein Basenaustausch im Codon 268 von TTA zu CTA (Leu268Leu).

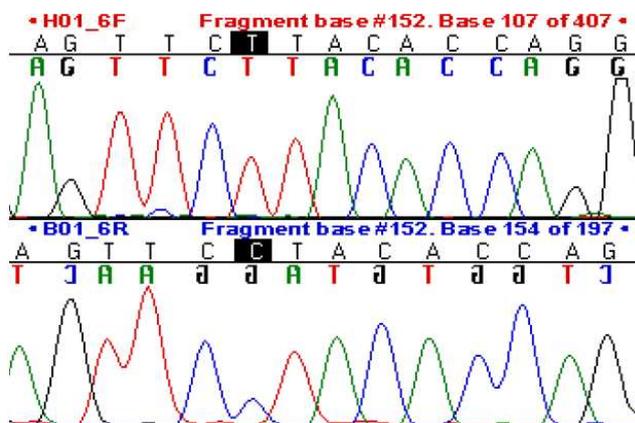


Abbildung 15: Ausschnitt der Sequenz mit der Variante in Exon 6. Probe H01 (Patient H07) dient als Referenzsequenz, Probe B01 (Patient H01) zeigt die synonyme homozygote Variante.

Der SNP in Exon 10 (c.1449C>T) trat bei 17% der HCM-Patienten heterozygot auf. Es erfolgte ein Basenaustausch im Codon 483 von ACC zu ACT (Thr483Thr).

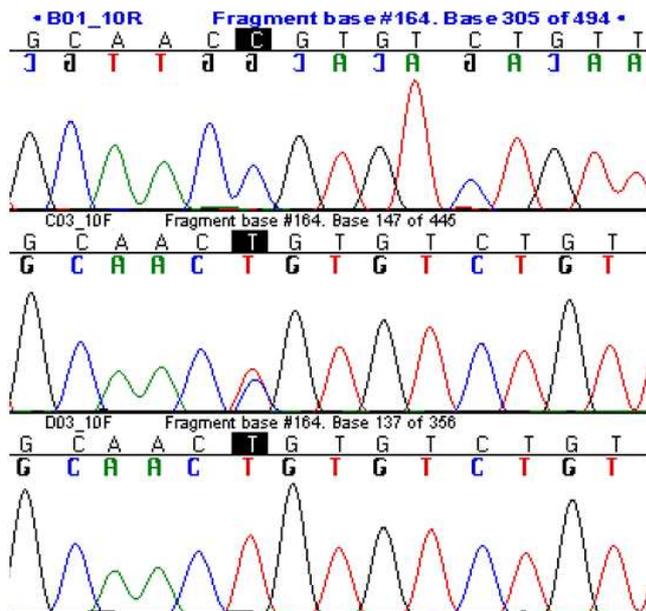


Abbildung 16: Ausschnitt der Sequenz mit der Variante in Exon 10. Probe B01 (Patient H01) dient als Referenzsequenz, Probe C03 (Patient H16) zeigt die heterozygote Variante, Probe D03 (Patient H17) die homozygote Variante.

Desweiteren wurden sechs unbekannte SNPs in Intronsequenzen gefunden. Es konnte ein heterozygoter Basenaustausch (c.848-4C>T) im Intronbereich vor Exon 7 nachgewiesen werden, welcher bei einem der HCM-Patienten auftrat. Ein SNP (c.1020+40C>T) war im Intronbereich hinter Exon 7 lokalisiert und trat bei einem der HCM-Patienten heterozygot auf. Ein SNP (c.1021-21C>G) war im Intronbereich vor Exon 8 lokalisiert und trat bei 89% der HCM-Patienten homozygot auf. Ein SNP (c.1159-33C>T) war im Intronbereich vor Exon 9 lokalisiert und trat bei 94% der HCM-Patienten homozygot auf. Ein SNP (c.2349+40T>C) war im Intronbereich hinter Exon 14 lokalisiert und trat bei einem der HCM-Patienten heterozygot auf. Ein SNP (c.2349+77G>A) war im Intronbereich hinter Exon 14 lokalisiert und trat bei drei der HCM-Patienten homozygot und bei 51% heterozygot auf.

Zusammenfassung der Ergebnisse der HCM-Patienten

Exon	Variante	Triplett	SNP DB	AS-Austausch	Häufigkeit	s/nsSNP
	c.-62T>G	-----	-----	-----	41% □	-----
3	c.332C>G	ACC/G	rs41274322	Thr111Thr	5% □	sSNP
	c.352G>A	G/ACA	rs17445840	Ala118Thr	5% □	nsSNP
6	c.802T>C	T/CTA	unbekannt	Leu268Leu	1x ■	sSNP
	c.848-4C>T	-----	unbekannt	-----	1x □	-----
7	c.938C>T	C/TCA	unbekannt	Pro313Ser	1x □	Mut
	c.1020+40C>T	-----	unbekannt	-----	1x □	-----
	c.1021-21C>G	-----	unbekannt	-----	100% ■	-----
8	c.1070A>T	AA/TT	unbekannt	Asn357Ile	1x □	Mut
	c.1159-33C>T	-----	unbekannt	-----	100% ■	-----
10	c.1431C>G	CCC/G	rs1628684	Pro477Pro	100% ■	sSNP

	c.1433C>T	CC/TT	unbekannt	Pro478Leu	3% □	nsSNP
	c.1449C>T	ACC/T	unbekannt	Thr483Thr	12% □	sSNP
	c.1495C>T	C/TCC	unbekannt	Pro499Ser	14% □, 1x ■	nsSNP
13	c.2091T>C	CGT/C	rs1220144	Arg697Arg	100% ■	sSNP
	c.2349+40T>C	-----	unbekannt	-----	1x □	-----
	c.2349+77G>A	-----	unbekannt	-----	52% □, 5% ■	-----
15	c.2448C>T	GCC/T	rs1041985	Ala816Ala	43% □, 5% ■	sSNP
16	c.2534A>G	AA/GT	rs2289664	Asn845Ser	3% □	nsSNP
	c.2721*37C>T	-----	-----	-----	5% □	-----

Tabelle 18: Ergebnisse der Sequenzierung des N-Cadherin-Gens aller HCM-Patienten. SNPs in Intron-Sequenzen (grau), sSNPs (grün), nsSNPs (gelb), Mutationen (rot); heterozygot (□), homozygot (■)

2.3. Ergebnisse der Screening-Untersuchung des gesunden Kontrollkollektivs und des HCM-Kontrollkollektivs

Im Anschluss an die Sequenzierung und Auswertung der Ergebnisse der NC- und HCM-Patienten, sollte überprüft werden, ob es sich bei den Varianten Pro313Ser und Asn357Ile um Mutationen handeln könnte. Mutationen sind nichtsynonyme Varianten, die nur sehr selten und nur bei erkrankten Individuen auftreten. Um die Häufigkeit ihres Auftretens genauer zu bestimmen, wurden die unter II.1. beschriebenen Kontrollkollektive aus herzgesunden und HCM-erkrankten Patienten auf diese Varianten hin untersucht. Die Proben der HCM-Patienten wurden dazu im Bereich der Exons 7 und 8 durch PCR und enzymatische Aufreinigung für die Sequenzierung vorbereitet, sequenziert und anschließend am Computer ausgewertet. Die DNA-Proben des herzgesunden Kontrollkollektivs von Exon 7 und 8 wurden durch PCR vervielfältigt. Exon 7 wurde anschließend enzymatisch aufgereinigt, sequenziert und ausgewertet. In Exon 8 erfolgte das Screening nach Patienten mit der Variante Asn357Ile durch eine RFLP-Analyse wie unter II.3.5. beschrieben.

Bei der RFLP-Analyse von Exon 8 mit dem Restriktionsenzym BsmI zeigten sich wie erwartet in der als Kontrolle aufgetragenen Probe H28 zwei kleinere Fragmente. Da diese Fragmente bei keiner der anderen Proben auftraten, wurde damit die Präsenz der Variante (Asn357Ile) im HCM-Kontrollkollektiv ausgeschlossen.

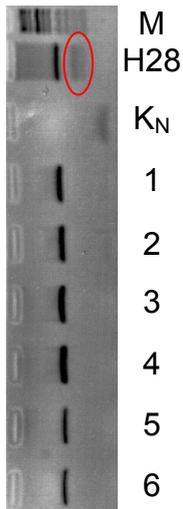


Abbildung 17: Ausschnitt eines Agarosegels der RFLP-Analyse in Exon 8. Probe H28 dient als Referenzsequenz (Restriktionsfragmente sind rot markiert). Die anderen Proben wiesen keine Restriktionsfragmente nach dem Verdau auf. Molekulargewichtsmarker VIII (M), Negativ-Kontrolle (K_N), Proben der Kontrollpatienten (1-6)

Bei der Auswertung der Sequenzierung von Exon 7 des HCM-Kollektivs konnte der gesuchte SNP (Pro313Ser) nicht gefunden werden. Allerdings konnten zwei weitere unbekannte synonyme SNPs identifiziert werden. Der SNP (c.939A>G) trat bei einer Probe homozygot auf. Es erfolgte ein Basenaustausch im Codon 313 von CCA zu CCG (Pro313Pro). Der andere SNP (c.993C>T) trat bei Probe 1993 heterozygot auf. Es erfolgte ein Basenaustausch im Codon 331 von ATC zu ATT (Ile331Ile). Weitere Varianten konnten nicht detektiert werden.

Die Ergebnisse der Screening-Untersuchung bestätigen den Verdacht, dass es sich bei den nichtsynonymen Varianten Pro313Ser und Asn357Ile um Mutationen handeln könnte.

Zusammenfassung der Ergebnisse der HCM-Kontrollen

Exon	Variante	Triplett	SNP DB	AS-Austausch	Häufigkeit	s/nsSNP
7	c.939A>G	CCA/G	unbekannt	Pro313Pro	1x ■	sSNP
	c.993C>T	ATC/T	unbekannt	Ile331Ile	1x □	sSNP

Tabelle 19: Ergebnisse der Sequenzierung des N-Cadherin-Gens aller HCM-Kontrollpatienten und der gesunden Kontrollpatienten. sSNPs (grün); heterozygot (□), homozygot (■)

3. Eigenschaften der Aminosäuren

An Position 313 wurde Prolin durch Serin ersetzt. Prolin ist ein kaum größer als Serin und Serin ist polar. Ansonsten sind sich beide Aminosäuren recht ähnlich.

An Position 357 wurde Asparagin durch Isoleucin ersetzt. Isoleucin ist aliphatisch, hydrophob und größer als das polare und saure Asparagin.

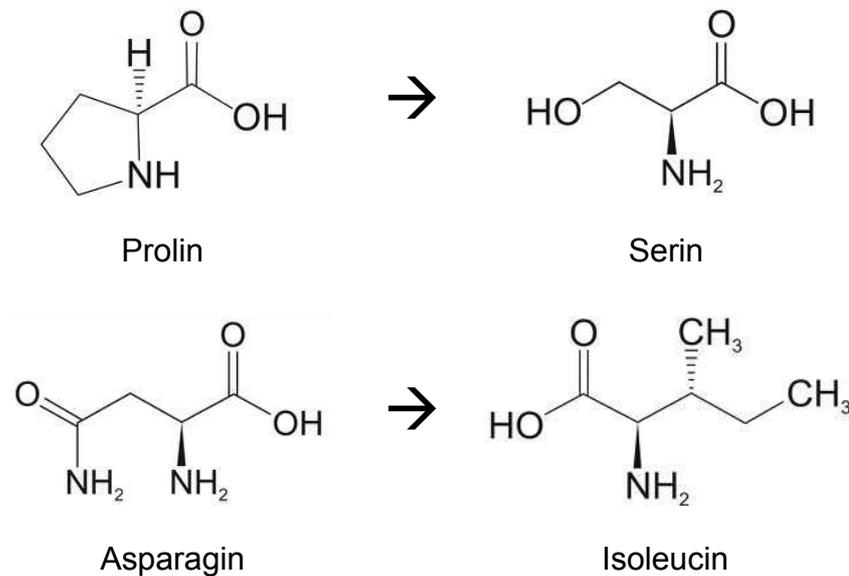


Abbildung 18: Strukturformeln der Aminosäuren

4. Konservierung der Aminosäuresequenz

Unter Konservierung versteht man den evolutionären Erhalt einer Aminosäuresequenz eines Genabschnittes zwischen Lebewesen unterschiedlicher Entwicklungsstufen. Die Konservierung desselben Genabschnittes verschiedener Spezies gibt einen Hinweis auf die Bedeutung der Sequenz. Ist ein Genabschnitt sowohl bei verschiedenen Säugetieren als auch bei den Wirbellosen identisch, so geht man von einer hohen Bedeutung dieses Genabschnittes aus. Unterliegt dieser Abschnitt jedoch einer hohen Varianz, so ist die Bedeutung mit großer Wahrscheinlichkeit eher gering.

Die Positionen der Mutationen sind in Tabelle 20 farblich markiert. Man kann bei beiden Mutationen erkennen, dass diese bei keiner der abgebildeten Spezies eine Veränderung zum Menschen aufweisen und folglich sehr hochkonserviert sind.

Gattung	AS-sequenz	AS-sequenz
Homo sapiens (Mensch)	IVSQAP P STPSP	TDMEGN N PTYGL
Pan troglodytes (Schimpanse)	IVSQAP P STPSP	TDMEGN N PTYGL
Canis lupus familiaris (Hund)	ILSQAP P STPSP	TDMEGN N PTYGL
Bos taurus (Rind)	ILSQAP P STPSP	TDMEGN N PTYGL
Mus musculus (Maus)	ILSQAP P STPSP	TDMEGN N PTYGL
Rattus norvegicus (Ratte)	ILSQAP P STPSP	TDMEGN N PTYGL
Gallus gallus (Bankivahuhn)	ILSQAP P SSPSP	TDMEGN N PTYGL
Danio rerio (Zebrafisch)	ILSQT P ESPSS	TDMEGN N PTYGL

Tabelle 20: Darstellung der Konservierung des N-Cadherin-Genabschnittes mit den beiden aufgezeigten Mutationen. Pro313Ser (blau), Asn357Ile (grün)

5. Klinische Befunde der Patienten

Bei den beiden Patienten H22 und H28 wurde eine HOCM (hypertrophe obstruktive Kardiomyopathie) diagnostiziert. Zum Zeitpunkt der Untersuchung waren die Patienten 69 (H22) und 73 Jahre (H28) alt. Beide Mutationen traten sporadisch auf. Eine Untersuchung von Familienangehörigen war nicht möglich. Bei Patient H22 wurde auf Grund der fortgeschrittenen Hypertrophie eine Myektomie durchgeführt.

Patient H22 ist männlich und wurde dem NYHA II-Stadium zugeordnet. Dies entspricht einer leichten Einschränkung der körperlichen Leistungsfähigkeit bei Beschwerdefreiheit in Ruhe. Die Wandstärkenmessung des interventrikulären Septums (IVS) und der Herzhinterwand (PWT) zeigen mit 18 mm und 19 mm eindeutig eine Hypertrophie des Herzmuskels an. Die Wanddicke des linken Ventrikels und des Septums beträgt im gesunden Myokard 8-12 mm. Das fractional shortening (systolische Verkürzungsfraction, FS) lag bei 56%, was auf eine normale Herzfunktion hindeutet.

Patient H28 ist weiblich und wurde dem NYHA III-Stadium zugeordnet. Dies entspricht einer höhergradigen Einschränkung der körperlichen Leistungsfähigkeit bei Beschwerdefreiheit in Ruhe. Das IVS wies eine Dicke von 19 mm auf, die PWT betrug 12 mm und das FS lag bei 45%. Auch diese Patientin weist neben einer Hypertrophie im Septumbereich eine normale Herzfunktion auf.

IV. Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit war es die Sequenz des N-Cadherin-Gens bei Patienten mit hypertropher Kardiomyopathie und bei Patienten mit Non-Compaction-Kardiomyopathie zu analysieren und Varianten aufzudecken.

1. Methodenkritik

Für die Vervielfältigung des entsprechenden DNA-Abschnittes wurde die PCR mit anschließender Sequenzierung als Screening-Methode gewählt, da die Sequenzierung eine hohe Spezifität und Sensitivität aufweist und sich verhältnismäßig zeit- und kostensparend umsetzen lässt.

Für die Sequenzierung benötigt man das zu sequenzierende Fragment in einer ausreichenden Menge. Dieses wurde durch PCR aus genomischer DNA amplifiziert. Eine weitere wichtige Voraussetzung für eine saubere Sequenzierung ist, dass die amplifizierte DNA-Probe frei von Nebenprodukten ist, welche die Sequenzanalyse behindern. Dazu wurde die PCR für jedes der 16 Exons optimiert, bis eine eindeutige Bande auf dem Agarosegel entstand und keine weiteren Banden oder Schlieren auf die Existenz von Nebenprodukten hinwiesen.

Bei Exon 1 und 10 konnte die PCR nur mit Hilfe der Additive DMSO und Betaine optimiert werden. Beide tragen zu einer Steigerung der Spezifität bei.

Die Sequenzierung verlief bei den meisten Proben unproblematisch. Einige Proben wiesen jedoch bei der ersten Sequenzierung Überlagerungen an den ersten Basen und im davor gelegenen Intron-Bereich auf und waren nicht auswertbar. Dies war eine Folge der zu dicht am Exonbeginn liegenden Forward-Primer. Diese Proben wurden erneut in der Gegenrichtung sequenziert, woraufhin sich alle Proben eindeutig analysieren ließen.

Vergleicht man die Häufigkeiten der nachgewiesenen, bekannten Varianten mit den in der Datenbank dbSNP (dbSNP 2012) aufgeführten Häufigkeiten, so zeigt sich eine gute Übereinstimmung. Die Variante Ala816Ala zum Beispiel tritt in den verwendeten Kohorten bei 43% (HCM) bzw. 45% (NC) heterozygot und bei 5% (HCM) bzw. 11% (HCM) homozygot auf. In der Datenbank dbSNP zeigen sich in der Kohorte

(ESP_Cohort_Populations) mit 4550 Patienten mit 38,2% heterozygoter Varianten und 6,6% homozygoter Varianten recht ähnliche Werte. Für die Variante Ala118Thr, welche bei 5% der HCM-Patienten heterozygot und bei keinem Patienten homozygot auftritt, zeigt sich in der Kohorte (ESP_Cohort_Populations) mit 4548 Patienten eine Häufigkeit für heterozygotes Auftreten von 8,8% und für homozygotes Auftreten von 0,2%. Die leichten Abweichungen lassen sich durch die geringere Kohortengröße (47 NC-Patienten, 58 HCM-Patienten) und die sich daraus ergebenden Schwankungen erklären.

2. Genetische Varianten

Auf die große Bedeutung des N-Cadherin-Gens im Zusammenhang mit Kardiomyopathien haben Kostetskii et al. 2005 aufmerksam gemacht, als sie in einem Tierversuch einen Tamoxifen-induzierbaren Knockout des N-Cadherin-Gens bei Mäusen erzeugten. Die Ergebnisse dieses Versuchs ließen eine Untersuchung des N-Cadherin-Gens auf genetische Veränderungen sinnvoll erscheinen.

In der vorliegenden Arbeit wurde das N-Cadherin-Gen von 58 Patienten mit HCM und 47 Patienten mit NC mittels PCR und Sequenzierung in allen 16 Exons auf Varianten bzw. Mutationen untersucht. Es wurden insgesamt 14 verschiedene Varianten innerhalb des kodierenden Bereichs aufgezeigt, von denen acht stumm waren. Die anderen sechs waren nichtsynonyme Varianten und ausschließlich bei Patienten mit HCM lokalisiert. Zwei dieser Varianten wurden bereits beschrieben. Von den vier unbeschriebenen Varianten traten zwei vermehrt auf und zwei (Pro313Ser, Asn357Ile) nur bei jeweils einem Patienten. Auch in den Kontrollkollektiven der HCM-Patienten und der herzgesunden Probanden konnten die einfach auftretenden heterozygoten Varianten nicht erneut nachgewiesen werden. Es handelt sich hierbei sehr wahrscheinlich um Mutationen, die mit der Erkrankung assoziiert sind. Ihre Allelfrequenz in den untersuchten Kollektiven beträgt 0,07%. Im Kollektiv der NC-Patienten wurden im kodierenden Bereich ausschließlich synonyme Varianten aufgedeckt.

Für eine mögliche HCM-Assoziation der beiden aufgezeigten mutmaßlichen Mutationen sprechen folgende Punkte:

1. Das Screening der 350 herzgesunden Patienten konnte keine der beiden mutmaßlichen Mutationen in diesem Kollektiv nachweisen. Dies deutet auf eine relativ geringe Wahrscheinlichkeit eines zufälligen Auftretens bei Patienten mit HCM hin.

2. Die Mutationen sind im Bereich der funktionellen Domäne des Cadherin-Repeats 2 (Kodon 262 bis 382) lokalisiert. Diese ist für die Bindung von Calcium-Ionen wichtig, wodurch es zu einer Stabilisierung der Cadherin-Struktur durch cis-Dimerisierung kommt. Erst diese Stabilisierung ermöglicht eine trans-Interaktion der Trp2-Domänen verschiedener Zellen im Rahmen des Zellverbundes. Ob allerdings die Mutationen einen Funktionsverlust in dieser Domäne erzeugen und ob dieser sich klinisch manifestiert, bleibt in weiteren Untersuchungen abzuklären. Denkbar wäre auch, dass die anderen vier Cadherin-Repeats des N-Cadherins die Struktur ausreichend stabilisieren können und somit die Funktion des N-Cadherins weiterhin teilweise bis vollständig erhalten bleibt. Eine andere Erklärung für die relativ späte Manifestation der Erkrankung könnte im heterozygoten Auftreten der Mutation zu suchen sein.

3. Eine Untersuchung der beiden veränderten Aminosäuren (siehe Abschnitt III.4.) ergab eine hohe Konservierung der entsprechenden Bereiche bis hin zu den wirbellosten Tieren. Die hohe Konservierung spricht für die große Bedeutung dieses Bereichs für die uneingeschränkte Funktion des Proteins.

4. Ein Vergleich der mutierten mit den analogen Aminosäuren zeigte als Unterschiede zwischen Prolin und Serin lediglich eine leichte Größendifferenz und dass Serin polar ist. Die Abweichungen sind nicht sehr stark, sodass man trotz einer Veränderung der Aminosäure eine weitgehend uneingeschränkte Funktion des N-Cadherins erwarten kann. Bei den Aminosäuren Asparagin und Isoleucin liegen ausgeprägtere Unterschiede vor (siehe Abschnitt III.3.). Diese strukturellen Unterschiede machen eine unveränderte Funktion des Proteins erheblich unwahrscheinlicher, auch wenn dies nur auf Schätzungen beruht.

5. Der Funktionsverlust einzelner Domänen kann bereits zu einem massiven Funktionsverlust des N-Cadherins führen, wie Xu et al. 2002 nachwies. Es besteht die Vermutung, dass die Tyrosin-Phosphatase PTP1B durch Bindung an das N-Cadherin und eine Dephosphorylierung der β -Catenin-Domäne die N-Cadherin-Funktion reguliert. Xu et al. benutzten Peptide zur konkurrierenden Bindung an die PTP1B-Bindungsdomäne des N-Cadherins, wodurch der Pool an Tyrosin-phosphoryliertem β -Catenin zunahm und sich

ein Funktionsverlust des N-Cadherins zeigte. Es wurde nicht effizient auf der Zelloberfläche exprimiert (Xu et al. 2002).

6. Schaltet man das N-Cadherin-Gen im Mausmodell vollkommen aus, so erhält man einen N-Cadherin-null Embryo. Luo et al. wiesen 2001 auf diese Weise nach, dass die N-Cadherin-vermittelte Zelladhäsion ein essentielles Überlebenssignal für embryonale Zellen darstellt und für die normale Herzentwicklung von großer Bedeutung ist. Die N-Cadherin-null Embryonen starben während der mittleren Schwangerschaftsperiode mit multiplen Entwicklungsdefekten (Luo et al. 2001).

Kostetskii et al. führten 2005 eine weitere Tierstudie durch, bei der sie einen Tamoxifen-induzierbaren Knockout des N-Cadherin-Gens bei Mäusen induzierten. Dies ermöglichte das „Abschalten“ des N-Cadherin-Gens im erwachsenen Myokard. Der Verlust des N-Cadherins führte dazu, dass die meisten Tiere innerhalb von zwei Monaten nach Tamoxifen-Gabe an spontanen ventrikulären Tachykardien einhergehend mit einem Verlust an Muskelspannung starben. Pathologische Untersuchungen ergaben eine mäßige dilatative Kardiomyopathie, einen Zerfall der Glanzstreifenstruktur sowie eine verminderte Sarkomerlänge und eine erhöhte Dicke der Z-Streifen (Kostetskii et al. 2005). Die Ursache für die Entwicklung von Arrhythmien könnte eine Destabilisierung von Gap-Junctions durch Störungen im N-Cadherin/Catenin-Komplexes sein (Li et al. 2005).

Die von Kostetskii et al. und Luo et al. beschriebenen Studien legen die Vermutung nahe, dass die im N-Cadherin-Gen vermuteten Mutationen bei Patienten mit Kardiomyopathien keinen kompletten Funktionsverlust erzeugen, da in diesem Falle eine Letalität im embryonalen Stadium zu erwarten wäre.

7. Das N-Cadherin ist das einzige klassische Cadherin im Herzmuskel und spielt eine wichtige Rolle bei der Zell-Zell-Adhäsion im Glanzstreifen der Herzmuskelzellen. Dabei interagiert es extrazellulär direkt mit den N-Cadherinen der Nachbarzellen und intrazellulär über verschiedene Moleküle (u.a. Plakoglobin und β -Catenin) mit dem Aktinzytoskelett und mit Intermediärfilamenten. Anhand von Doppel-Knockout-Mäusen, bei denen sowohl das Plakoglobin als auch das β -Catenin ausgeschaltet wurde, konnten Swope et al. 2012 nachweisen, dass die N-Cadherin-Bindungspartner Plakoglobin und β -Catenin für die mechanoelektrische Kopplung der Herzmuskelzellen unerlässlich sind (Swope et al. 2012).

8. Der Nachweis eines direkten Zusammenhangs zwischen genetischen Kardiomyopathien des Menschen und Mutationen im N-Cadherin-Gen wurde noch nicht zweifelsfrei nachgewiesen. Für viele Verknüpfungproteine zwischen dem Zytoskelett und dem N-Cadherin wurde dieser Einfluss bereits dargelegt. Auf Grund der funktionellen Beziehung dieser Elemente, wäre es nur logisch, wenn auch Mutationen im N-Cadherin-Gen Kardiomyopathien verursachen.

Alle diese Punkte belegen die große Bedeutung des N-Cadherin-Gens für die Entwicklung von genetischen Kardiomyopathien. Es ist somit ein ausgezeichnete Kandidat für genetische Analysen bei Patienten mit Kardiomyopathien. Welche Kardiomyopathien aber das Resultat einer Mutation des N-Cadherin-Gens sein könnten, lässt sich nur schwer voraussagen. Wie Kreuder 2004 angibt, können genetische Läsionen der gleichen Struktur- und Funktionsproteine zu unterschiedlichen morphologischen Manifestationen führen (Kreuder 2004). Ein Beispiel dafür sind Mutationen in der schweren Kette des β -Myosins (β -MYH7), die sowohl zu DCM als auch zu HCM führen können (Tanjore et al. 2010). Erschwerend kommt noch hinzu, dass genetische Läsionen unterschiedlicher Struktur- und Funktionsproteine zu sehr ähnlichen oder identischen Krankheitsbildern führen können. So verursachen Mutationen in verschiedenen desmosomalen Proteinen ebenso eine arrhythmogene rechtsventrikuläre Kardiomyopathie / Dysplasie (ARVC/D) wie beispielsweise genetische Defekte im Transforming growth factor β 3 (TGF β 3) (Corrado et al. 2011). Viele Untersuchungen konnten keine Korrelation zwischen Lokalisation oder Typ der Mutation und dem kardialen Phänotyp oder der Schwere der Erkrankung nachweisen (Pankuweit et al. 2008).

Abgesehen von den beiden mutmaßlichen Mutationen im Bereich des Cadherin-Repeats 2 wurden vier nichtsynonyme SNPs identifiziert, von denen zwei bereits bekannt sind. Es ist nicht auszuschließen, dass ein nichtsynonymer SNP über eine Änderung der Proteinstruktur einen Einfluss auf die Entwicklung einer HCM besitzt.

Die Varianten Asn845Ser und Pro478Leu (Allelfrequenz 0,95%) sowie Ala118Thr (Allelfrequenz 1,43%) traten, im Gegensatz zur Variante Pro499Ser (Allel-Frequenz 4,76%), nur selten auf.

Untersucht man die Konservierung der Aminosäuren an der jeweiligen Position, so gelangt man bei den Varianten Ala118Thr, Pro478Leu und Asn845Ser auf Grund der niedrigen Konservierung zu der Annahme, dass diese Aminosäuren eher von untergeordneter Bedeutung sind.

Es ist fraglich, ob der SNP Ala118Thr im Bereich des Propeptids beispielsweise eine Spaltung desselben verhindern und somit die Funktion des N-Cadherins verändern könnte. Auch ein Einfluss des C-terminal der β -Catenin-Bindungsstelle lokalisierten SNPs Asn845Ser auf die Funktion des N-Cadherins ist noch unbekannt. Ein wenig wahrscheinlicher wäre ein störender Einfluss des SNPs Pro478Leu, welcher im funktionell wichtigen Cadherin-Repeat 3 lokalisiert ist.

Von größerem Interesse dürfte der SNP Pro499Ser sein. Prolin ist an dieser Stelle hochkonserviert, was auf eine funktionelle Bedeutung hinweisen kann. Ein weiteres Indiz dafür ist die Lage im funktionell bedeutsamen Bereich des Cadherin-Repeats 4. Ob und wie stark sich ein Funktionsverlust manifestiert, ist noch nicht erwiesen.

Aus den Ergebnissen dieser Arbeit lassen sich weitere Themen für wissenschaftliche Arbeiten im Bereich der Aufklärung genetischer Kardiomyopathien entwickeln. Von großer Bedeutung wäre eine klinische und genetische Untersuchung der Familien der Mutationsträger um das Vorliegen einer HCM abzuklären und den Zusammenhang mit den aufgezeigten mutmaßlichen Mutationen besser verstehen zu können. Leider stehen die Patienten dafür nicht zur Verfügung. Die Träger der Mutationen sollten im Bereich kardial relevanter Gene auf weitere Mutationen untersucht werden, um gegebenenfalls eine Kombination mehrerer Gendefekte aufzudecken. Desweiteren sollte die durch die Mutationen hervorgerufene Veränderungen an der Proteinstruktur untersucht werden, um daraus entstehende funktionelle Einschränkungen zu definieren. Durch ein umfassendes Screening weiterer Patientenkollektive mit und ohne Kardiomyopathien kann die Häufigkeit des Auftretens der Mutationen genauer bestimmt werden.

V. Zusammenfassung

Die hypertrophe Kardiomyopathie (HCM) ist die zweithäufigste Kardiomyopathie und die häufigste hereditäre kardiale Erkrankung. Als primäre genetische Kardiomyopathie gewinnt die Non-Compaction-Kardiomyopathie (NC) zunehmend an Bedeutung.

Veränderungen in der Struktur der Kopplungsproteine zwischen N-Cadherin und Zytoskelett können zu Kardiomyopathien führen. N-Cadherin dient als einziges klassisches Cadherin der Verbindung von Herzmuskelzellen und der Stabilisierung ihres Zytoskeletts. Sein eingeschränkter oder totaler Funktionsverlust im Tierversuch weist schwerwiegende Folgen auf. Ein Nachweis von Mutationen im N-Cadherin-Gen, welche eine Kardiomyopathie verursachen, steht noch aus.

Das Aufzeigen von Mutationen im N-Cadherin-Gen könnte das Verständnis für die Ätiologie der Erkrankung verbessern und neue Möglichkeiten für Diagnostik und Therapie eröffnen.

In dieser Arbeit wurden die N-Cadherin-Gene von 58 Patienten mit HCM und von 47 Patienten mit NC auf Mutationen untersucht. Dazu wurde die Patienten-DNA aus Leukozyten extrahiert und alle 16 Exons des N-Cadherin-Gens mittels PCR amplifiziert. Anschließend erfolgte die Sequenzierung und der Vergleich mit der Referenzsequenz. Im N-Cadherin-Gen konnten insgesamt 14 Varianten aufgezeigt werden, von denen sechs bereits bekannt waren. Neben acht synonymen SNPs konnten vier nichtsynonyme Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNPs) sowie zwei mutmaßliche Mutationen nachgewiesen werden. Anschließend wurde noch ein Kontrollkollektiv aus 350 gesunden Patienten und ein Kollektiv aus weiteren 233 HCM-Patienten auf die Mutation hin untersucht. Hierfür wurde neben der Sequenzierung auch die Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismen-Analyse angewandt.

Es konnten vier nichtsynonyme SNPs und zwei Mutationen, die alle in der Gruppe der HCM-Patienten auftraten, im Rahmen dieser Arbeit identifiziert und als mögliche genetische Ursache für die HCM diskutiert werden. Eine vollständige Aufklärung der Bedeutung dieser Varianten und deren Zusammenhang mit genetischen Kardiomyopathien bleibt jedoch weiteren Untersuchungen vorbehalten.

VI. Literaturverzeichnis

- Aberle, H., H. Schwartz and R. Kemler (1996). "Cadherin-catenin complex: protein interactions and their implications for cadherin function." J Cell Biochem **61**(4): 514-523.
- Agmon, Y., H. M. Connolly, L. J. Olson, et al. (1999). "Noncompaction of the ventricular myocardium." J Am Soc Echocardiogr **12**(10): 859-863.
- Allenby, P. A., N. S. Gould, M. F. Schwartz, et al. (1988). "Dysplastic cardiac development presenting as cardiomyopathy." Arch Pathol Lab Med **112**(12): 1255-1258.
- Alsaileek, A. A., I. Syed, J. B. Seward, et al. (2008). "Myocardial fibrosis of left ventricle: magnetic resonance imaging in noncompaction." J Magn Reson Imaging **27**(3): 621-624.
- Angst, B. D., C. Marcozzi and A. I. Magee (2001). "The cadherin superfamily: diversity in form and function." J Cell Sci **114**(Pt 4): 629-641.
- Bernanke, D. H. and J. M. Velkey (2002). "Development of the coronary blood supply: changing concepts and current ideas." Anat Rec **269**(4): 198-208.
- Bleyl, S. B., B. R. Mumford, M. C. Brown-Harrison, et al. (1997). "Xq28-linked noncompaction of the left ventricular myocardium: prenatal diagnosis and pathologic analysis of affected individuals." Am J Med Genet **72**(3): 257-265.
- Bob, R. A. u. K. (2001). Innere Medizin. Stuttgart, Thieme.
- Borrmann, C. M., C. Grund, C. Kuhn, et al. (2006). "The area composita of adhering junctions connecting heart muscle cells of vertebrates. II. Colocalizations of desmosomal and fascia adhaerens molecules in the intercalated disk." Eur J Cell Biol **85**(6): 469-485.
- Bos, J. M., J. A. Towbin and M. J. Ackerman (2009). "Diagnostic, prognostic, and therapeutic implications of genetic testing for hypertrophic cardiomyopathy." J Am Coll Cardiol **54**(3): 201-211.
- Boyd, M. T., J. B. Seward, A. J. Tajik, et al. (1987). "Frequency and location of prominent left ventricular trabeculations at autopsy in 474 normal human hearts: implications for evaluation of mural thrombi by two-dimensional echocardiography." J Am Coll Cardiol **9**(2): 323-326.

- Braunwald, E., C. T. Lambrew, S. D. Rockoff, et al. (1964). "Idiopathic Hypertrophic Subaortic Stenosis. I. A Description of the Disease Based Upon an Analysis of 64 Patients." Circulation **30**: SUPPL 4:3-119.
- Conraads, V., B. Paelinck, A. Vorlat, et al. (2001). "Isolated non-compaction of the left ventricle: a rare indication for transplantation." J Heart Lung Transplant **20**(8): 904-907.
- Corrado, D., C. Basso, K. Pilichou, et al. (2011). "Molecular biology and clinical management of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy/dysplasia." Heart **97**(7): 530-539.
- Corrado, G., G. Fazio, E. Zachara, et al. (2008). "Natural History of Isolated Noncompaction of the Ventricular Myocardium in Adults. Data from the Società Italiana di Ecografia Cardiovascolare (SIEC) Registry " Circ J **118**: 948.
- dbSNP (2012). "<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>." zuletzt aufgerufen am 17.09.2012 um 18:00 Uhr.
- Derycke, L. D. and M. E. Bracke (2004). "N-cadherin in the spotlight of cell-cell adhesion, differentiation, embryogenesis, invasion and signalling." Int J Dev Biol **48**(5-6): 463-476.
- Dilsizian, V., R. O. Bonow, S. E. Epstein, et al. (1993). "Myocardial ischemia detected by thallium scintigraphy is frequently related to cardiac arrest and syncope in young patients with hypertrophic cardiomyopathy." J Am Coll Cardiol **22**(3): 796-804.
- Engberding, R., T. M. Yelbuz and G. Breithardt (2007). "Isolated noncompaction of the left ventricular myocardium -- a review of the literature two decades after the initial case description." Clin Res Cardiol **96**(7): 481-488.
- Ensembl (2012). "<http://www.ensembl.org/index.html>." zuletzt aufgerufen am 17.09.2012 um 18:00 Uhr.
- Epstein, A. E., J. P. Dimarco, K. A. Ellenbogen, et al. (2008). "ACC/AHA/HRS 2008 Guidelines for device-based therapy of cardiac rhythm abnormalities." Heart Rhythm **5**(6): e1-62.
- Erdmann, P. D. E. (2008). Klinische Kardiologie: Krankheiten des Herzens, des Kreislaufs und der herznahen Gefäße. Berlin, Springer.
- Espinola-Zavaleta, N., M. E. Soto, L. M. Castellanos, et al. (2006). "Non-compacted cardiomyopathy: clinical-echocardiographic study." Cardiovasc Ultrasound **4**: 35.

- Franke, W. W., C. M. Borrmann, C. Grund, et al. (2006). "The area composita of adhering junctions connecting heart muscle cells of vertebrates. I. Molecular definition in intercalated disks of cardiomyocytes by immunoelectron microscopy of desmosomal proteins." Eur J Cell Biol **85**(2): 69-82.
- Freedom, R. M., S. J. Yoo, D. Perrin, et al. (2005). "The morphological spectrum of ventricular noncompaction." Cardiol Young **15**(4): 345-364.
- Garcia-Castro, M. I., E. Vielmetter and M. Bronner-Fraser (2000). "N-Cadherin, a cell adhesion molecule involved in establishment of embryonic left-right asymmetry." Science **288**(5468): 1047-1051.
- Gehmlich, K., C. Geier, K. J. Osterziel, et al. (2004). "Decreased interactions of mutant muscle LIM protein (MLP) with N-RAP and alpha-actinin and their implication for hypertrophic cardiomyopathy." Cell Tissue Res **317**(2): 129-136.
- Harada, H., A. Kimura, K. Fukino, et al. (2002). "Genomic structure and eight novel exonic polymorphisms of the human N-cadherin gene." J Hum Genet **47**(6): 330-332.
- HGVS (2012). "<http://www.hgvs.org/>" zuletzt aufgerufen am 17.09.2012 um 18:20 Uhr.
- Ichida, F., S. Tsubata, K. R. Bowles, et al. (2001). "Novel gene mutations in patients with left ventricular noncompaction or Barth syndrome." Circulation **103**(9): 1256-1263.
- Jenni, R., E. Oechslin, J. Schneider, et al. (2001). "Echocardiographic and pathoanatomical characteristics of isolated left ventricular non-compaction: a step towards classification as a distinct cardiomyopathy." Heart **86**(6): 666-671.
- Jenni, R., E. N. Oechslin and B. van der Loo (2007). "Isolated ventricular non-compaction of the myocardium in adults." Heart **93**(1): 11-15.
- Jenni, R., C. A. Wyss, E. N. Oechslin, et al. (2002). "Isolated ventricular noncompaction is associated with coronary microcirculatory dysfunction." J Am Coll Cardiol **39**(3): 450-454.
- Junga, G., S. Kneifel, A. Von Smekal, et al. (1999). "Myocardial ischaemia in children with isolated ventricular non-compaction." Eur Heart J **20**(12): 910-916.
- Klaassen, S., S. Probst, E. Oechslin, et al. (2008). "Mutations in sarcomere protein genes in left ventricular noncompaction." Circulation **117**(22): 2893-2901.
- Kostetskii, I., J. Li, Y. Xiong, et al. (2005). "Induced deletion of the N-cadherin gene in the heart leads to dissolution of the intercalated disc structure." Circ Res **96**(3): 346-354.

- Kreuder, J. (2004). "Kardiomyopathien - Klinische und pathogenetisch-pathophysiologische Grundlagen." Monatsschrift Kinderheilkunde **6**: 620-631.
- Li, J., V. V. Patel, I. Kostetskii, et al. (2005). "Cardiac-specific loss of N-cadherin leads to alteration in connexins with conduction slowing and arrhythmogenesis." Circ Res **97**(5): 474-481.
- Linask, K. K., K. A. Knudsen and Y. H. Gui (1997). "N-cadherin-catenin interaction: necessary component of cardiac cell compartmentalization during early vertebrate heart development." Dev Biol **185**(2): 148-164.
- Luo, Y., M. Ferreira-Cornwell, H. Baldwin, et al. (2001). "Rescuing the N-cadherin knockout by cardiac-specific expression of N- or E-cadherin." Development **128**(4): 459-469.
- Maron, B. J. (2001). "The electrocardiogram as a diagnostic tool for hypertrophic cardiomyopathy: revisited." Ann Noninvasive Electrocardiol **6**(4): 277-279.
- Maron, B. J. (2006). "Contemporary Definitions and Classification of the Cardiomyopathies." Circulation.
- Maron, B. J., W. J. McKenna, G. K. Danielson, et al. (2003a). "American College of Cardiology/European Society of Cardiology clinical expert consensus document on hypertrophic cardiomyopathy. A report of the American College of Cardiology Foundation Task Force on Clinical Expert Consensus Documents and the European Society of Cardiology Committee for Practice Guidelines." J Am Coll Cardiol **42**(9): 1687-1713.
- Maron, B. J., R. A. Nishimura and G. K. Danielson (1998). "Pitfalls in clinical recognition and a novel operative approach for hypertrophic cardiomyopathy with severe outflow obstruction due to anomalous papillary muscle." Circulation **98**(23): 2505-2508.
- Maron, B. J. and W. C. Roberts (1979). "Quantitative analysis of cardiac muscle cell disorganization in the ventricular septum of patients with hypertrophic cardiomyopathy." Circulation **59**(4): 689-706.
- Maron, M. S., I. Olivotto, S. Betocchi, et al. (2003b). "Effect of left ventricular outflow tract obstruction on clinical outcome in hypertrophic cardiomyopathy." N Engl J Med **348**(4): 295-303.
- McLeod, C. J., M. J. Ackerman, R. A. Nishimura, et al. (2009). "Outcome of patients with hypertrophic cardiomyopathy and a normal electrocardiogram." J Am Coll Cardiol **54**(3): 229-233.

- Mohrs, O. K., A. Magedanz and T. Schlosser (2007). "Noncompaction of the left ventricular myocardium detected by 64-slice multidetector computed tomography." Clin Cardiol **30**(1): 48.
- Murphy, R. T., R. Thaman, J. G. Blanes, et al. (2005). "Natural history and familial characteristics of isolated left ventricular non-compaction." Eur Heart J **26**(2): 187-192.
- NCBI (2012). "<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>." zuletzt aufgerufen am 17.09.2012 um 18:10 Uhr.
- Oechslin, E. N., C. H. Attenhofer Jost, J. R. Rojas, et al. (2000). "Long-term follow-up of 34 adults with isolated left ventricular noncompaction: a distinct cardiomyopathy with poor prognosis." J Am Coll Cardiol **36**(2): 493-500.
- Olson, T. M., S. Illenberger, N. Y. Kishimoto, et al. (2002). "Metavinculin mutations alter actin interaction in dilated cardiomyopathy." Circulation **105**(4): 431-437.
- Ong, L. L., N. Kim, T. Mima, et al. (1998). "Trabecular myocytes of the embryonic heart require N-cadherin for migratory unit identity." Dev Biol **193**(1): 1-9.
- Pankuweit, S., A. Richter, V. Ruppert, et al. (2008). "[Classification, genetic predisposition and risk factors for the development of cardiomyopathies]." Internist (Berl) **49**(4): 441-442, 444-447.
- Pieperhoff, S. and W. W. Franke (2007). "The area composita of adhering junctions connecting heart muscle cells of vertebrates - IV: coalescence and amalgamation of desmosomal and adhaerens junction components - late processes in mammalian heart development." Eur J Cell Biol **86**(7): 377-391.
- Radice, G. L., H. Rayburn, H. Matsunami, et al. (1997). "Developmental defects in mouse embryos lacking N-cadherin." Dev Biol **181**(1): 64-78.
- Sato, Y., N. Matsumoto, H. Takahashi, et al. (2006). "Cardioverter defibrillator implantation in an adult with isolated noncompaction of the ventricular myocardium." Int J Cardiol **110**(3): 417-419.
- Sengupta, P. P., J. C. Mohan, V. Mehta, et al. (2004). "Comparison of echocardiographic features of noncompaction of the left ventricle in adults versus idiopathic dilated cardiomyopathy in adults." Am J Cardiol **94**(3): 389-391.
- Shiraishi, I., T. Takamatsu and S. Fujita (1993). "3-D observation of N-cadherin expression during cardiac myofibrillogenesis of the chick embryo using a confocal laser scanning microscope." Anat Embryol (Berl) **187**(2): 115-120.

- Steinberg, M. S. and P. M. McNutt (1999). "Cadherins and their connections: adhesion junctions have broader functions." Curr Opin Cell Biol **11**(5): 554-560.
- Stollberger, C. and J. Finsterer (2004). "Trabeculation and left ventricular hypertrabeculation/noncompaction." J Am Soc Echocardiogr **17**(10): 1120-1121; aothor reply 1121.
- Stollberger, C. and J. Finsterer (2006). "Pitfalls in the diagnosis of left ventricular hypertrabeculation/non-compaction." Postgrad Med J **82**(972): 679-683.
- Stollberger, C., J. Finsterer and G. Blazek (2002). "Left ventricular hypertrabeculation/noncompaction and association with additional cardiac abnormalities and neuromuscular disorders." Am J Cardiol **90**(8): 899-902.
- Stollberger, C., M. Winkler-Dworak, G. Blazek, et al. (2007). "Prognosis of left ventricular hypertrabeculation/noncompaction is dependent on cardiac and neuromuscular comorbidity." Int J Cardiol **121**(2): 189-193.
- Struber, M., A. L. Meyer, D. Malehsa, et al. (2009). "The current status of heart transplantation and the development of "artificial heart systems"." Dtsch Arztebl Int **106**(28-29): 471-477.
- Swope, D., L. Cheng, E. Gao, et al. (2012). "Loss of Cadherin-Binding Proteins beta-Catenin and Plakoglobin in the Heart Leads to Gap Junction Remodeling and Arrhythmogenesis." Mol Cell Biol **32**(6): 1056-1067.
- Tanjore, R., A. Rangaraju, S. Vadapalli, et al. (2010). "Genetic variations of beta-MYH7 in hypertrophic cardiomyopathy and dilated cardiomyopathy." Indian J Hum Genet **16**(2): 67-71.
- Toyono, M., C. Kondo, Y. Nakajima, et al. (2001). "Effects of carvedilol on left ventricular function, mass, and scintigraphic findings in isolated left ventricular non-compaction." Heart **86**(1): E4.
- Wallis, J., M. F. Fox and F. S. Walsh (1994). "Structure of the human N-cadherin gene: YAC analysis and fine chromosomal mapping to 18q11.2." Genomics **22**(1): 172-179.
- Weiford, B. C., V. D. Subbarao and K. M. Mulhern (2004). "Noncompaction of the ventricular myocardium." Circulation **109**(24): 2965-2971.
- Xu, G., C. Arregui, J. Lilien, et al. (2002). "PTP1B modulates the association of beta-catenin with N-cadherin through binding to an adjacent and partially overlapping target site." J Biol Chem **277**(51): 49989-49997.

Yagi, T. and M. Takeichi (2000). "Cadherin superfamily genes: functions, genomic organization, and neurologic diversity." Genes Dev **14**(10): 1169-1180.

VII. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: a) Schnittpräparat und b) schematische Darstellung eines Herzens mit NC

Towbin, J. A., N. E. Bowles (2002). "The failing heart" Nature 415, 227-233

http://www.nature.com/nature/journal/v415/n6868/fig_tab/415227a_F4.html (zuletzt aufgerufen am 16.09.2012 um 15.15 Uhr) 3

Abbildung 2: Schematische Darstellung der Area composita

K. S. Großmann (2006). "Bedeutung von Plakophilin 2 für die Bildung von Zellverbindungen zwischen Herzmuskelzellen und die Morphogenese des Herzens" Berlin.

<http://edoc.hu-berlin.de/dissertationen/grossmann-katja-susann-2005-10-25/HTML/chapter1.html> (zuletzt aufgerufen am 16.09.2012 um 15.45 Uhr) 10

Abbildung 3: Schematischer Aufbau eines N-Cadherins

Okuda, T., L. M. Y. Yu, et al. (2007). "β-Catenin regulates excitatory postsynaptic strength at hippocampal synapses" PNAS 104 (33): 13479-13484

<http://www.pnas.org/content/104/33/13479.full> (zuletzt aufgerufen am 16.09.2012 um 16.10 Uhr) 12

Abbildung 4: Schema für die Wirkung der Calcium-Ionenkonzentration auf Cadherine

Pertz, O., D. Bozic, et al. (1999). "A new crystal structure, Ca²⁺ dependence and mutational analysis reveal molecular details of E-cadherin homoassociation" EMBO Journal 18: 1738-1747

<http://www.nature.com/emboj/journal/v18/n7/images/7591602f6.jpg> (zuletzt aufgerufen am 16.09.2012 um 16.20 Uhr) 13

Abbildung 5: Bandenmuster des Molekulargewichtsmarkers VIII

Fermentas International Inc. "pUC Mix Marker, 8, ready-to-use"

http://www.fermentas.de/product_info.php?info=p1065 (zuletzt aufgerufen am 16.09.2012 um 16.40 Uhr) 18

Abbildung 6: Agarosegel von Exon 1 zur Kontrolle der Amplifikationsprodukte 25

Abbildung 7: Agarosegel zur Kontrolle der Fragmentlänge	34
Abbildung 8: Ausschnitt der Sequenz mit der Variante in Exon 15	36
Abbildung 9: Ausschnitt der Sequenz mit der Variante in Exon 3	37
Abbildung 10: Ausschnitt der Sequenz mit der Variante in Exon 15	38
Abbildung 11: Ausschnitt der Sequenz mit der Variante in Exon 7	39
Abbildung 12: Ausschnitt der Sequenz mit der Variante in Exon 8	39
Abbildung 13: Ausschnitt der Sequenz mit der Variante in Exon 10	39
Abbildung 14: Ausschnitt der Sequenz mit der Variante in Exon 10	40
Abbildung 15: Ausschnitt der Sequenz mit der Variante in Exon 6	40
Abbildung 16: Ausschnitt der Sequenz mit der Variante in Exon 10	41
Abbildung 17: Ausschnitt eines Agarosegels der RFLP-Analyse in Exon 8	43
Abbildung 18: Strukturformeln Prolin, Serin, Asparagin, Isoleucin http://de.wikipedia.org/wiki/Prolin , http://de.wikipedia.org/wiki/Serin , http://de.wikipedia.org/wiki/Asparagin , http://de.wikipedia.org/wiki/Isoleucin (zuletzt aufgerufen am 16.09.2012 um 17.00 Uhr)	44
Diagramm 1: Eichkurve für den DNA-Molekulargewichtsmarker VIII	34

VIII. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Primerpaare der N-Cadherin Exons	19
Tabelle 2: Reaktionsgemisch für PCR	22
Tabelle 3: Gradiententabelle zur Bestimmung der Annealingtemperatur	23
Tabelle 4: Grundprogramm der PCR	23
Tabelle 5: optimierter Reaktionsansatz für Exon 2-9 und 11-16	23
Tabelle 6: optimierter Reaktionsansatz für Exon 1	24
Tabelle 7: optimierter Reaktionsansatz für Exon 10	24
Tabelle 8: optimiertes Cyclor-Programm aller NCAD-Exons	25
Tabelle 9: Angaben zu den ddNTPs	26
Tabelle 10: Reaktionsansatz für die enzymatische Aufreinigung	27
Tabelle 11: Ansatz für das Cycle-Sequencing	28
Tabelle 12: Programm für das Cycle-Sequencing	28
Tabelle 13: mögliche Restriktionsenzyme	32
Tabelle 14: Restriktionsenzym BsmI mit Erkennungssequenz	32
Tabelle 15: Reaktionsansatz für RFLP-Analyse mit BsmI	32
Tabelle 16: Optimierung der NCAD-Primerpaare	33
Tabelle 17: Ergebnisse der Sequenzierung aller NC-Patienten	37
Tabelle 18: Ergebnisse der Sequenzierung aller HCM-Patienten	41
Tabelle 19: Ergebnisse der Sequenzierung aller Kontrollpatienten	43
Tabelle 20: Darstellung der Konservierung	45

IX. Abkürzungsverzeichnis

Amplifikation	exponentielles Vermehren eines DNA-Abschnittes
Annealing	Anlagerung
ARVC/D	arrhythmogene rechtsventrikuläre Kardiomyopathie / Dysplasie
AS	Aminosäure
Betaine	(N,N,N-Trimethylglycin)
β-MYH7	schwere Kette des β-Myosins
bp	Basenpaare
CDH-2	N-Cadherin
DCM	Dilatative Kardiomyopathie (dilated cardiomyopathy)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (Desoxyribonucleic Acid)
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
et al.	et alli (lateinisch: und andere)
Exon	Teil der genomischen DNA, der in Protein umgesetzt wird
F	vorwärts (forward)
FS	fractional shortening (prozentuale systolische Durchmesserverkürzung des Herzens während des Pumpvorganges)
g	Gramm
HAV-Sequenz	Histidin-Alanin-Valin-Sequenz
HCM	hypertrophe Kardiomyopathie
hetero	heterozygot
HNCM	hypertrophe nicht-obstruktive Kardiomyopathie
HOCM	hypertrophe obstruktive Kardiomyopathie
homo	homozygot
ICD	Implantierbarer Kardioverter-Defibrillator
ID	Intercalated Disc (Z-Scheibe)
IVS	Interventrikuläres Septum
kb	Kilobasen
min	Minuten
mM	Millimolar

µl	Mikroliter
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NC	Non-Compaction-Kardiomyopathie
NCAD	N-Cadherin
nm	Nanometer
NYHA	New York Heart Association
Oligonukleotid	kurzer DNA-Strang (<100 bp)
PCR	Polymerase Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaktion)
pmol	Picomolar
Primer	Amplifikations-Starter-Oligonukleotid
PTP1B	Protein-Threonin Phosphatase
PWT	Posterior Wall Thickness
R	rückwärts (reverse)
RFLP	Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus
SNP	Einzel-Nukleotid-Polymorphismus
T _{AN}	Annealingtemperatur (Anlagerungstemperatur der Primer)
Taq	Thermus Aquaticus
TBE-Puffer	Tris/Borat/EDTA-Puffer
Template	Zielsequenz
TGFβ3	Transforming growth factor β3
Thermocycler	programmierbares Thermostat
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TM	Schmelztemperatur
U	Units (Enzymeinheit)

X. Selbstständigkeitserklärung

„Ich, Klaus Donandt, erkläre an Eides statt, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: , Genetische Analysen des N-Cadherin-Gens bei Patienten mit Non-Compaction-Kardiomyopathie | Genetische Analysen des N-Cadherin-Gens bei Patienten mit hypertropher Kardiomyopathie‘ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Datum

Unterschrift

Danksagung

Mein herzliches Dankeschön gilt allen, die mich bei dieser Arbeit unterstützt haben.

An erster Stelle sind hier Priv.-Doz. Dr. med. C. Özcelik für die Bereitstellung des Dissertationsthemas und Dipl.-Ing. Andreas Perrot für die vorzügliche Betreuung sowie den allzeit verfügbaren kollegialen Rat zu nennen.

Für die allgegenwärtige Unterstützung, die freundliche Hilfsbereitschaft und die unendliche Geduld möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des KardioGenetischen Labors bedanken.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern, für die kontinuierliche Unterstützung und Motivation während der Doktorarbeit und während des Studiums.

Zu guter Letzt möchte ich auch den Patienten für ihre Kooperationsbereitschaft danken.

Lebenslauf

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