

Aus der medizinischen Klinik II  
der Universität zu Lübeck  
Direktor: Prof. Dr. med. H. Schunkert

**Bedeutung von intronischen Sequenzvarianten  
im Gen des Myosinbindungsproteins C3 für den  
Phänotyp einer Hypertrophen Kardiomyopathie**

Inauguraldissertation  
zur  
Erlangung der Doktorwürde  
der Universität zu Lübeck  
- Aus der Medizinischen Fakultät -

von  
Wittich von Tenspolde  
aus Göttingen

Lübeck 2008

1. Berichterstatterin: Privat-Dozentin Dr. rer. nat Jeanette Erdmann

2. Berichterstatterin: Prof. Dr. rer. nat. Christine Zühlke

Tag der mündlichen Prüfung: 30.06.2008

zum Druck genehmigt. Lübeck, den 30.06.2008

gez. Prof. Dr. med. Werner Solbach

- Dekan der Medizinischen Fakultät -

Für meine Eltern

## Inhaltsverzeichnis I

	Seite
<b>Abkürzungen</b> .....	I
<b>Zusammenfassung</b> .....	V
<b>1. Einleitung</b> .....	5
1.1 Definition und Klassifikation der Hypertrophen Kardiomyopathie ....	5
1.2 Epidemiologie .....	7
1.3 Ätiologie.....	8
1.4 Vererbungsmodus .....	10
1.5 Pathologie und Klinik .....	10
1.6 Diagnose .....	12
1.7 Therapie .....	13
1.8 Aufbau des Sarkomers und Kontraktionszyklus .....	15
1.9 Struktur und Funktion des Myosinbindungsproteins .....	16
1.10 Beziehung zwischen Genotyp und Phänotyp .....	18
1.11 Intronische Varianten als Ursache eines Phänotyps.....	19
1.12 Fragestellung.....	20
<b>2. Material und Methoden</b> .....	22
2.1 Chemikalien.....	22
2.2 Geräte.....	23
2.3 Verbrauchsmaterialien.....	24
2.4 Lösungen und Ansätze.....	25
2.5 Patienten .....	27
2.6 DNA-Gewinnung.....	29
2.7 DNA-Amplifikation und Polymerase-Kettenreaktion.....	29
2.8 Gelelektrophorese .....	31
2.9 Aufreinigung und Sequenzierung der Proben.....	32
2.10 Auswertung der Sequenzen .....	33
2.11 Single-Stranded Conformation Polymorphism-Analyse .....	33
2.12 Probenansatz für SSCP-PCR.....	35
2.13 PAA-Gele.....	36

## Inhaltsverzeichnis II

	Seite
2.14 Silberfärbung .....	36
2.15 Homologievergleich mittels BLAT .....	37
2.16 Statistische Verfahren.....	38
<b>3. Ergebnisse</b> .....	<b>39</b>
3.1 Auswertung der Gelelektrophorese .....	39
3.2 Ergebnisse der SSCP.....	40
3.3 Sequenzanalysen .....	40
3.3.1 5` -200 del (G). .....	43
3.3.2 Intron 2 -303 C/T.....	44
3.3.3 Intron 4 -180 del (A).....	45
3.3.4 Intron 5 -12 del (C).....	47
3.3.5 Intron 11 -111 G/T .....	47
3.3.6 Intron 11 -2 A/G .....	50
3.3.7 Exon 11 C/A, p.S311X.....	52
3.3.8 Exon 14 ins (C), p.P452X .....	54
3.3.9 Intron 20 -123 ins (GAGACTT).....	55
3.3.10 Intron 22 -123 del (TC) .....	56
3.3.11 Exon 25 C/G, p.T956S.....	56
3.3.12 Exon 28 del (G), p.G1078X .....	58
3.3.13 Intron 31 -90 G/A .....	60
3.3.14 Intron 32 -91 G/A.....	60
3.3.15 Bereits bekannte Varianten .....	62
3.4 Statistische Berechnung.....	62
<b>4. Diskussion</b> .....	<b>65</b>
4.1 Auswahl der Patienten.....	65
4.2 Material und Methoden.....	66
4.3 Varianten in Exons des MYBPC3-Gens .....	70
4.3.1 Exon 11 C/A, p.S311X.....	70
4.3.2 Exon 14 ins (C), p.P452X .....	73
4.3.3 Exon 25 C/G, p.T956S.....	74

### **Inhaltsverzeichnis III**

	Seite
4.3.4 Exon 28 del (G), p.G1078X .....	75
4.4 Intronsche Varianten des MYBPC3-Gens.....	76
4.4.1 Int. 11 -2 A/G: Spleißstellenmutation mit Bedeutung für den Phänotyp einer HCM .....	77
4.4.2 Int. 11 -111 G/T: tiefe intronsche Mutation als Ursache für HCM .....	79
4.4.3 Weitere Intronvarianten .....	81
4.4.4 Auffinden funktioneller Sequenzen in Introns .....	82
4.5 Schlussfolgerung .....	85
<b>5. Anhang</b> .....	<b>88</b>
5.1 Quellenverzeichnis .....	88
5.2 Erklärung über Zustimmung der Ethikkommission.....	104
5.3 Danksagung .....	105
5.4 Lebenslauf .....	106

## Abkürzungen

A	Adenin bei Bezugnahme auf DNA bzw. Alanin bei Bezugnahme auf Aminosäuren
Abb.	Abbildung
ACE	Angiotensin Converting Enzyme
ACTC1	Aktin
AHA	American Heart Association
$\alpha$ -MHC	$\alpha$ -Myosin schwere Kette
$\alpha$ -TM	$\alpha$ -Tropomyosin
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosin-Triphosphat
Aufl.	Auflage
BLAT	Human Basic Local Alignment Search Tool
$\beta$ -MHC	$\beta$ -Myosin schwere Kette
BMI	Bodymaß-Index
bp	Basenpaar
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin bei Bezugnahme auf DNA bzw. Cystein bei Bezugnahme auf Aminosäuren
° C	Grad Celsius
ca.	circa
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cDNA	komplementäre DNA (engl. <i>complementary DNA</i> )
cTnT	kardiales Troponin T
cTnI	kardiales Troponin I
cTnC	kardiales Troponin C
DCM	dilatative Kardiomyopathie (engl. <i>dilated cardiomyopathy</i> )
dt.	deutsch
del	Deletion
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl. <i>desoxyribonucleic acid</i> )
E	Glutamat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat

EKG	Elektrokardiogramm
engl.	englisch
essen.	essentiell
et al.	und andere (lateinisch <i>et alteri</i> )
G	Guanin bei Bezugnahme auf DNA bzw. Glycin bei Bezugnahme auf Aminosäuren
g.	Position im Genom
ggf.	gegebenenfalls
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
HCM	Hypertrophe Kardiomyopathie (engl. <i>hypertrophic cardiomyopathy</i> )
Hg	Quecksilber
HOCM	obstruktive Hypertrophe Kardiomyopathie
HW	Hinterwand
I	Isoleucin
Ig	Immunglobulin
ins	Insertion
Int.	Intron
IVS	Interventrikularseptum des Herzens
kg	Kilogramm
L	Liter bei Bezugnahme auf Mengenangaben bzw. Leucin bei Bezugnahme auf Aminosäuren
LAMP	Lysosomen-assoziiertes Membranprotein 2
LVEDD	linksventrikulärer enddiastolischer Durchmesser
LVEF	linksventrikuläre Ejektionsfraktion
M	Methionin
MAF	Allelfrequenz der Mutation
min	Minuten
miRNA	Mikro-Ribonukleinsäure
MLC	Myosin essentielle leichte Kette
µl	Mikroliter
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mRNA	messenger-RNA
MRT	Magnetresonanztomographie

mV	Millivolt
MYBPC	Myosinbindungsprotein C
n	Anzahl
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
NHOCM	nicht obstruktive Hypertrophe Kardiomyopathie
NYHA	New York Heart Association
p	Position auf dem kurzen Arm eines Chromosoms
p.	Proteinposition
P	Prolin
PAA	Polyacrylamid
PCR	Polymerase Kettenreaktion (engl. <i>polymerase chain reaction</i> )
PRKAG2	Proteinkinase G2
q	Position auf dem langen Arm eines Chromosoms
Q	Glutamin
R	Arginin
RNA	Ribonukleinsäure (engl. <i>ribonucleic acid</i> )
RT	Raumtemperatur
S	Serin
S.	Seite
s. a.	siehe auch
SAM	Vorwärtsbewegung des Mitralsegels (engl. <i>systolic anterior movement</i> )
SCD	plötzlicher Herztod (engl. <i>sudden cardiac death</i> )
sec	Sekunden
sog.	sogenannt
SSCP	Einzelstrang-Konformationspolymorphismus (engl. <i>single-stranded conformation polymorphism</i> )
T	Thymin bei Bezugnahme auf DNA bzw. Threonin bei Bezugnahme auf Aminosäuren
Tab.	Tabelle
TASH	transkoronare Ablation der Septumhypertrophie
TBE	Tris-Borat-Ethylendiamintetraacetat
TEMED	Tetramethylethylendiamin

TM	Tropomyosin
TTN	Titin
u.	und
u. a.	unter anderem
UCSC	University of Carolina Santa Cruz
UV-Licht	ultraviolettes Licht
V	Valin bei Bezugnahme auf Aminosäuren bzw. Volt bei Bezugnahme auf elektrische Spannung
v. a.	vor allem
W	Tryptophan
WHO	World Health Organisation
X	Stop-Codon in der Nukleotidsequenz

## Zusammenfassung

Die Hypertrophe Kardiomyopathie (HCM) ist eine Herzerkrankung, die phänotypisch durch einen hypertrophierten linken Ventrikel gekennzeichnet ist. Als Ursache der HCM sind Mutationen in verschiedenen Sarkomergenen bekannt. Das Gen des Myosinbindungsproteins C3 (MYBPC3) ist besonders häufig betroffen. Mit derzeitigen Screeningverfahren kann in etwa 60% der Fälle eine pathogene Mutation in einem der Sarkomergene als Ursache einer HCM gefunden werden. Die Mutationen befinden sich in Exons der Gene oder im Bereich von Intron-Exon-Übergängen.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden intronische Sequenzen des MYBPC3-Gens mit dem Ziel untersucht, ob etwaige Varianten Einfluss auf den Phänotyp einer HCM haben. Hierzu wurde von 44 Patienten mit bekannter HCM ca. 60% des MYBPC3-Gens sequenziert.

Es wurden insgesamt 20 exonische und 27 intronische Varianten bei den untersuchten Patienten gefunden. Darunter befinden sich drei Varianten in Exons, die definitionsgemäß als pathogen gelten (p.S311X, p.P452X und p.G1078X). Sie waren im Rahmen eines zuvor durchgeführten Screenings mittels Single-Stranded Conformation Polymorphism (SSCP) nicht entdeckt worden. Somit konnte gezeigt werden, dass die SSCP als verbreitete Methode zur Mutationssuche bei HCM kein hinreichend sensitives Verfahren ist.

Weiter fanden sich zwei Varianten in Introns, von denen eine ebenfalls als pathogen gilt (Intron 11 -2 A/G). Die andere verursacht sehr wahrscheinlich den Phänotyp einer HCM (Intron 11 -111 G/T). Abgesehen von einer Ausnahme (Intron 11 -2 A/G) befindet sich keine der intronischen Varianten in einem Bereich, der im Homologievergleich mit 27 Tierspezies starke Konservierung zeigt. Es ist daher anzunehmen, dass die übrigen gefundenen intronischen Varianten bedeutungslos für den Phänotyp einer HCM sind. Daraus ergibt sich die Schlussfolgerung, dass im Gegensatz zu anderen Erkrankungen, eine Suche nach tiefen intronischen Mutationen bei HCM für das MYBPC3 nach derzeitiger Datenlage nicht erforderlich ist.

## 1. Einleitung

### 1.1 Definition und Klassifikation der Hypertrophen Kardiomyopathie

Nach derzeitiger Definition der American Heart Association (AHA) gehört die Hypertrophe Kardiomyopathie (engl. *hypertrophic cardiomyopathy*, HCM) zur Gruppe der Herzmuskelerkrankungen (Kardiomyopathien) (93). Diese Gruppe kennzeichnet Erkrankungen des Myokards, die gewöhnlich mit einer unangemessenen Hypertrophie oder Dilatation eines Ventrikels einhergehen. Mit Hypertrophie wird hier die strukturelle Veränderung von Kardiomyozyten bezeichnet, die einer Zellvergrößerung durch Zunahme von Zellkomponenten entspricht (26, 93).

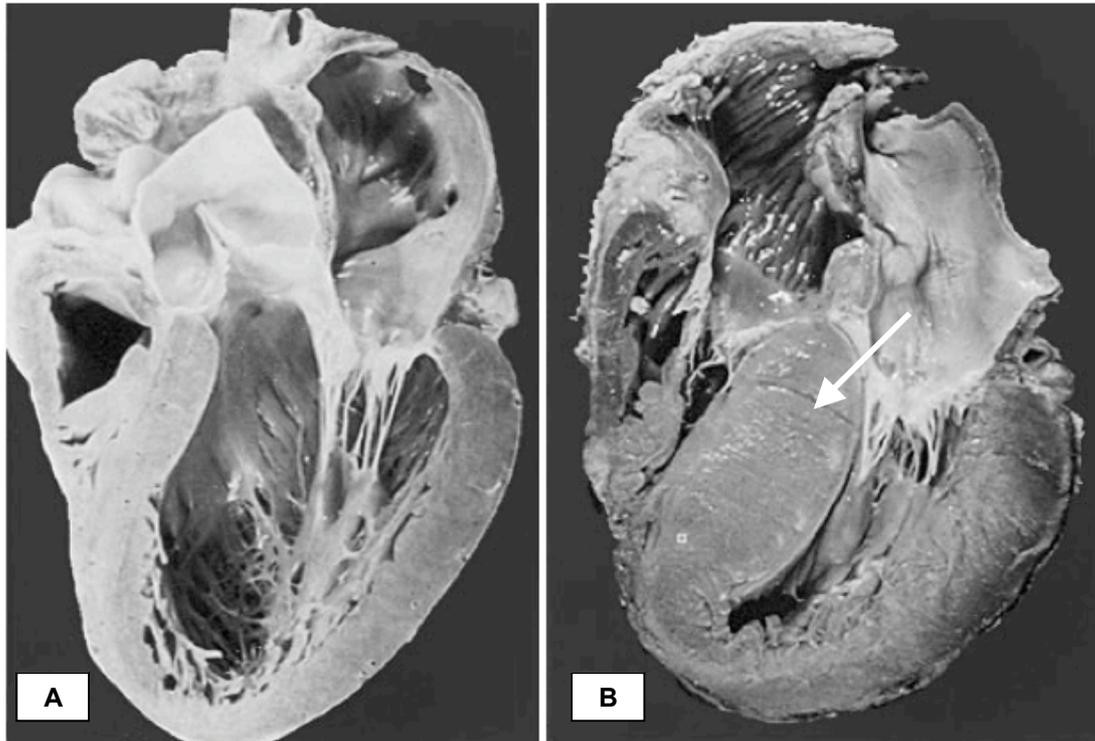
Die Klassifikation der Kardiomyopathien richtet sich gemäß der AHA danach, ob die Erkrankung auf das Myokard beschränkt ist, oder ob im Rahmen einer systemischen Erkrankung weitere Organe betroffen sind. Isolierte Myokarderkrankungen werden als *primäre* Kardiomyopathien bezeichnet. Erkrankungen des Herzmuskels, die Teil einer generalisierten Erkrankung sind, werden als *sekundäre* Kardiomyopathien bezeichnet (93).

Die HCM zählt zu den primären Kardiomyopathien. Ihre Ursache ist genetisch bedingt. Sie ist somit eine angeborene Erkrankung. Von der HCM werden primäre Kardiomyopathien abgegrenzt, die eine erworbene oder multifaktorielle Ursache haben (93).

Als genaue Ursache für die HCM werden Mutationen in Genen angegeben, die für Proteine des Sarkomers kodieren (93).

Morphologisches Korrelat der HCM ist ein meist asymmetrisch hypertrophierter linker Ventrikel (71). Andere Erkrankungen, die eine derartige Ventrikelhypertrophie verursachen könnten, liegen nicht vor (93). Die systolische Ventrikelfunktion ist nicht eingeschränkt. Die Aktion des Myokards ist bei der HCM eher hyperdynamisch (132, 148).

Abb 1.1 zeigt ein gesundes Herz und ein Herz bei HCM im Vergleich.



**Abb. 1.1 Obduktionsbefunde eines gesunden Herzens (A) und eines Herzens bei HCM (B) im Sagittalschnitt:** Beim Vergleich der beiden Herzen ist das stark hypertrophierte Myokard des linken Ventrikels bei HCM (B) auffällig. Besonders deutlich erkennbar ist die Hypertrophie im Bereich des Interventrikularseptums (Pfeil). Abb. aus Seidman et al. (132).

Anhand echokardiographischer Kriterien lässt sich die HCM weiter in eine obstruktive Hypertrophe Kardiomyopathie (HOCM) und in eine nicht obstruktive Hypertrophe Kardiomyopathie (NHOCM) unterteilen abhängig davon, ob eine Verlegung des Ausflusstrakts innerhalb des Ventrikels vorliegt oder nicht (82). Die Obstruktionen sind dynamisch. Ihr Ausmaß variiert von Tag zu Tag (70). Die Mehrzahl der Patienten (75%) hat keine Obstruktion (84).

HOCM und NHOCM werden echokardiographisch und angiographisch weiter unterteilt (82):

#### HOCM

- subaortaler Typ (80%): Septumhypertrophie bewirkt Obstruktion, systolische Vorwärtsbewegung der anterioren Mitralklappe (engl. *systolic anterior movement*, SAM) lässt Druckgradienten in der Ausflussbahn entstehen.

- mittelventrikulärer Typ (20%): Obstruktion in der Ventrikelmitte zwischen Septum und Papillarmuskel lokalisiert

#### NHOCM

- subaortal-apikaler Typ (40%): Septumhypertrophie subaortal
- apikaler Typ (30%): Hypertrophie besonders in Herzspitze ausgeprägt
- konzentrischer Typ (15%): gesamtes linksventrikuläres Myokard hypertrophiert
- reiner Papillarmuskeltyp (15%): nur Papillarmuskel hypertrophiert

Histopathologisch finden sich bei Erkrankten mit HCM charakteristische Veränderungen der Kardiomyozyten. Die Zellen des Herzmuskels sind hypertrophiert. Sie fallen weiter durch eine ziellose Anordnung (engl. *myocyte disarray*) und gestörte interzelluläre Verbindungen auf (24, 121, 132). Daneben kann auch eine Fibrose des Myokards bestehen (66, 80, 132).

Die aktuelle Definition und Klassifikation für Kardiomyopathien der World Health Organisation (WHO) stammt aus dem Jahr 1995 (127). Seitdem sind v. a. im Bereich der Ätiologie der Kardiomyopathien viele neue Erkenntnisse gewonnen worden, so dass ihre Definition heute ungenau und unvollständig ist (93, 150). Deshalb ist in dieser Arbeit die zeitgemäßere Definition der AHA berücksichtigt, wenn von der HCM die Rede ist.

## **1.2 Epidemiologie**

Übereinstimmende Angaben zur Prävalenz der HCM gibt es nicht. Nach Schätzungen, die auf echokardiographischen Screening-Untersuchungen beruhen, liegt die Häufigkeit von klinisch nicht erklärbaren linksventrikulären Hypertrophien bei ungefähr 1:500 (89). Geringere Werte für die Prävalenz wurden in einer älteren Untersuchung ermittelt. Hier ergab sich als Resultat einer Studie eine Häufigkeit von ungefähr 1:2500 (18).

Angaben zur Prävalenz der HCM werden kritisch betrachtet. Die komplizierte Wahl eines geeigneten Probandenkollektivs und die teils schwierige

Diagnosestellung stellen methodische Probleme dar, die leicht zu Fehleinschätzungen führen (39).

Es wird angenommen, dass ca. 60% der unerklärbaren Hypertrophien durch eine HCM verursacht werden (63, 97, 125). Damit ist die HCM die häufigste genetisch bedingte kardiovaskuläre Erkrankung beim Menschen (63, 84).

Begründete Hinweise auf bevorzugtes Auftreten einer HCM durch Sarkomergenmutationen in bestimmten Bevölkerungsgruppen liegen derzeit nicht vor. Es gibt jedoch Beobachtungen, nach denen die Penetranz der Erkrankung bei Männern stärker als bei Frauen ausgeprägt ist (16).

### **1.3 Ätiologie**

Gemäß der Definition und Klassifikation der AHA wird die HCM durch Mutationen in Genen verursacht, die für Proteine des Sarkomers kodieren (93). Unter dem Begriff Mutation versteht man seltene Veränderungen in der DNA. Davon werden Polymorphismen abgegrenzt. Sie sind DNA-Varianten, die mit einer Häufigkeit von mehr als einem Prozent in einer Population auftreten (145).

Im Jahr 1990 wurde die erste pathogene Mutation für eine HCM im Gen der schweren Kette des  $\beta$ -Myosin entdeckt (46). Bis zum gegenwärtigen Zeitpunkt sind mehr als 400 Mutationen von Sarkomergenen bekannt, die eine HCM verursachen können. Sie betreffen 11 Gene des Filamentapparates (63). Zudem sind weitere Gene struktureller Sarkomerbestandteile identifiziert worden, die bei Mutation mit einer HCM assoziiert sind. Diese Mutationen betreffen Gene, die für Strukturen an der Z-Scheibe des Sarkomers kodieren (45, 58, 116).

Tab. 1.3 gibt einen Überblick über die betroffenen Filamentkomponenten, ihre Gene und die Anzahl bisher gefundener Mutationen.

Symbol	Protein	Lokus	Anzahl an Mutationen
MYBPC3	Myosinbindungsprotein C3	11q11.2	> 50
$\beta$ -MHC	$\beta$ -Myosin schwere Kette	14q11.2	> 80
$\alpha$ -MHC	$\alpha$ -Myosin schwere Kette	14q11.2	< 5
cTnT	kardiales Troponin T	1q32	> 20
cTnI	kardiales Troponin I	19q13.4	> 10
cTnC	kardiales Troponin C	3p21	1
$\alpha$ -TM	$\alpha$ -Tropomyosin	15q22	8
MLC-1	Myosin essen. leichte Kette 1	3p21	2
MLC-2	Myosin essen. leichte Kette 2	12q24.1	8
ACTC1	Aktin	15q14	5
TTN	Titin	2q24.3	1

**Tab. 1.3 Proteine des Filamentapparates, deren Gene bei Mutation eine HCM verursachen können:** Unter *Symbol* findet sich das Akronym des Gens, das für das Protein kodiert. Unter *Lokus* ist das Chromosom genannt, auf dem das Gen liegt. Mit *q* ist eine Position auf dem langen Arm des Chromosoms, mit *p* eine Position auf dem kurzen Arm des Chromosoms gekennzeichnet. Die Anzahl der bislang gefundenen Mutationen ist in der letzten Spalte vermerkt. Tabelle nach Ho et al. modifiziert (63).

Die Ausprägung des Phänotyps von Mutationsträgern ist sehr heterogen.

Die Penetranz der HCM und die individuelle Prognose hängen davon ab, welches Gen verändert ist, und welchen Effekt die Mutation auf die Funktion der Kardiomyozyten ausübt (93).

Mutationen im MYBPC3 gelten als prognostisch günstig und können ein vergleichsweise spätes Manifestationsalter haben (110). Gleichzeitig sind aber auch pathologische Sequenzvarianten desselben Gens bekannt, die eine ausgeprägte Penetranz mit schlechterer Prognose verursachen (74).

Sogar Träger derselben Mutation können unterschiedliche Phänotypen ausbilden (115). Daher wird vermutet, dass es Cofaktoren gibt, die die Ausprägung der HCM beeinflussen (28). Derartige Cofaktoren können weitere Mutationen in anderen Genen sein (engl. *disease modifying genes*). Bestimmte Sequenzvarianten im Gen für das Angiotensin Converting Enzyme (ACE) und den Angiotensin 2-Rezeptor sollen einen solchen beeinflussenden Effekt ausüben (25, 115, 119).

Interessanterweise können einzelne Gene, die bei Mutation eine HCM verursachen, bei Vorliegen spezifischer Mutationen auch eine dilatative Kardiomyopathie (engl. *dilated cardiomyopathy*, DCM) auslösen. Zu diesen Genen gehört auch das MYBPC3 (23, 108).

#### **1.4 Vererbungsmodus**

Im Jahr 1961 wurde erstmals eine Beschreibung einer Familie mit offensichtlich vererbter Ventrikelhypertrophie publiziert. Die Analyse ihres Stammbaums zeigte einen autosomal-dominanten Erbgang (69).

1993 konnten Carrier et al. einen Locus für die HCM auf Chromosom 11 ausfindig machen (15). Zwei Jahre später gelang es, Mutationen im Gen des MYBPC3 als Ursache der HCM in einer Familie zu identifizieren (156).

Es wird davon ausgegangen, dass ca. 50% der HCM-Fälle im Rahmen einer familiären Erkrankung auftreten (69). Der Erbgang ist in der Regel autosomal-dominant (50). Neben der familiären Form treten auch sporadische Mutationen auf, die eine HCM verursachen (132).

#### **1.5 Pathologie und Klinik**

Bei der HCM kommt es als Folge mutierter Sarkomergene zur Hypertrophie von Kardiomyozyten. Die hypertrophierten und strukturell veränderten Zellen können vorzeitig zugrunde gehen. Das untergegangene Gewebe wird dann durch Fibroblasten und extrazelluläre Matrix ersetzt. Im Rahmen dieser Umbauvorgänge kommt es zur Fibrose des Myokards (132). Folge der Fibrosierung und der Hypertrophie ist eine Versteifung des Myokards (27). Die Versteifung manifestiert sich funktionell in einer verminderten Relaxationsfähigkeit der Ventrikelwände während der Diastole (132). Die HCM ist daher durch eine diastolische Funktionsstörung gekennzeichnet (10, 83). Es kann in ihrer Folge zur verminderten Ventrikelfüllung mit Rückstau des Blutes in den Vorhof kommen (84, 132).

Aufgrund der diastolischen Funktionsstörung und einer ggf. vorhandenen Obstruktion der ventrikulären Ausflussbahn können sich Symptome entwickeln. Sie treten bevorzugt bei körperlicher Belastung auf und können sich in Form von Dyspnoe äußern (12, 84, 157). Weitere Symptome der HCM sind Schwindel, Präsynkopen und Synkopen (157).

Symptom einer HCM kann auch ein ischämischer Brustschmerz im Sinne einer Angina pectoris sein (44). Die sich so zeigende koronare Insuffizienz wird dadurch verursacht, dass die Koronararterien nicht mehr in der Lage sind, eine ausreichende Menge Blut für einen zu stark hypertrophierten Muskel bereitzustellen. Als weitere Ursache mit derselben Wirkung kommt eine Wandverdickung intramuraler Arteriolen in Betracht (90, 94).

Erstes und gravierendes Symptom einer HCM kann auch der plötzliche Herztod (engl. *sudden cardiac death*, SCD) sein (129). Der SCD ist definiert als unerwarteter, natürlicher Tod kardialer Genese. Definitionsgemäß tritt ein Bewusstseinsverlust binnen einer Stunde bei Auftreten kardialer Symptome ein (106, 124). Unter jungen Sportlern ist der plötzliche Herztod durch HCM die häufigste Todesursache (87, 88).

Im Endstadium der Erkrankung treten Zeichen und Symptome einer schweren Herzinsuffizienz auf. Dieses Stadium ist durch eine zusätzliche systolische Funktionsstörung gekennzeichnet (55).

Es ist beobachtet worden, dass Patienten ohne Obstruktion (NHOCM) insgesamt mildere Symptome haben. Ein Teil der Patienten mit HCM ist asymptomatisch (90, 157, 159).

## **1.6 Diagnose**

Die Diagnose einer HCM ergibt sich aus Befunden verschiedener Untersuchungen.

Die Anamnese dient dazu, Symptome der HCM aufzudecken, Erstmanifestation, Verlauf und Ausmaß der Beschwerden abzuklären. Sie dient auch zur individuellen Risikoabschätzung für einen plötzlichen Herztod. Mit Hilfe der Familienanamnese können sich wichtige Hinweise auf das Vorliegen eines familiären genetischen Defekts ergeben (157).

Die körperliche Untersuchung ergibt meist keine zuverlässigen Befunde (84). Als Ausdruck einer subaortalen Obstruktion können systolische Herzgeräusche über der Herzspitze auskultierbar sein (21). Die Herzgeräusche sind in ihrer Intensität vom Ausmaß der Obstruktion abhängig und können provoziert werden (157).

Die Echokardiographie ist das wichtigste Verfahren zur Diagnosestellung (105). Sie stellt den Umfang und die Verteilung der Ventrikelhypertrophie dar. Ebenso können Funktionsstörungen des Ventrikels und hämodynamisch relevante Obstruktionen mittels Dopplertechnik dargestellt werden (107, 157). Funktionsstörungen finden sich auch bereits bei Mutationsträgern ohne Ventrikelhypertrophie (107).

Am häufigsten ist bei der HCM das Interventrikularseptum (IVS) vergrößert (9). Als normal gelten Größen bis 12 mm Wandstärke (40). In Abgrenzung zum physiologisch hypertrophierten Ventrikel, wie beim sog. „Sportlerherz“, überschreitet das Myokard im Gegensatz zur HCM Größen von 16 mm nicht (92, 118).

Nicht selten ist die Diagnose der HCM ein Zufallsbefund während einer echokardiographischen Untersuchung, wenn Anamnese und körperliche Untersuchung unauffällig sind.

Magnetresonanztomographie (MRT) oder Herzkatheteruntersuchungen können weiterführende Erkenntnisse erbringen, wenn mittels Echokardiographie eine Myokardhypertrophie und ventrikuläre Dysfunktionen nicht

eindeutig dargestellt werden können (128, 157). In der Routinediagnostik der HCM haben beide Verfahren aber bislang keine Bedeutung.

Befunde des Elektrokardiogramms (EKG) und Röntgenaufnahmen des Thorax sind unspezifisch. Sie können jedoch die Diagnose stützen (157).

Mittels molekulargenetischer Untersuchungen kann in ca. 50-60% der Fälle eine Mutation in einem Gen für Sarkomerproteine als Ursachen einer HCM nachgewiesen werden (139). Derzeit wird die molekulargenetische Untersuchung aber nicht als Diagnostikmethode angewandt.

### **1.7 Therapie**

Wegen der großen Heterogenität von Mutationen und der individuell sehr unterschiedlichen Klinik, gibt es keine allgemein gültigen Therapierichtlinien zur HCM. Vielmehr ist eine individuelle Therapie nötig (140).

Gegenwärtige Therapien der HCM basieren kaum auf randomisierten kontrollierten Studien, sondern sind Ergebnis empirischer Beobachtungen und retrospektiver Studien (139).

Gewöhnlich wird zur Ersttherapie symptomatischer Patienten ein  $\beta$ -Blocker eingesetzt (90, 139, 140). Die Wirkung der  $\beta$ -Blocker wird durch eine Senkung der Herzfrequenz erklärt. Der negativ chronotrope Effekt verlängert die Relaxationszeit und Diastolendauer. Beides führt zu einer stärkeren Ventrikelfüllung. Der negativ inotrope Effekt der Medikamente reduziert den myokardialen Sauerstoffbedarf (90, 140). Nicht unumstritten ist der Einsatz des Kalziumantagonisten Verapamil. Er bewirkt ähnliche Effekte wie  $\beta$ -Blocker. Es ist jedoch von Todesfällen bei HCM-Patienten unter der Therapie mit Verapamil berichtet worden, die durch ungünstige hämodynamische Effekte infolge einer Vasodilatation erklärt werden (33, 158).

Die Anwendung von Antiarrhythmika, weiteren Kalziumantagonisten, Diuretika sowie die Kombination der Medikamente ist besonderen Einzelfällen

vorbehalten. Nitroglycerin, ACE-Hemmer und Digitalispräparate sind zumindest bei einer HOCM kontraindiziert (90).

Symptomatische Patienten, die gegenüber einer medikamentösen Behandlung therapierefraktär sind und unter Beschwerden leiden, die den NYHA Klassen III und IV entsprechen, kommen für eine operative Therapie in Frage (90).

Als Goldstandard operativer Maßnahmen bei HOCM hat sich die septale Myektomie nach Marrow etabliert (90). Bei dieser Operation wird durch chirurgisches Abtragen von Myokard der Ausflusstrakt des Ventrikels vergrößert. Mechanische Hindernisse in der Blutstrombahn werden so beseitigt (102).

Bei einigen Patienten mit HCM liegt gleichzeitig ein Mitralklappenfehler vor. Bei solchen Patienten erwies sich in bestimmten Fällen auch ein kombinierter oder alleiniger Klappenersatz als vorteilhaft (86, 120).

Eine weitere Möglichkeit, die Myokardmasse zu reduzieren, stellt die transkoronare Ablation der Septumhypertrophie (TASH) mit Alkohol dar. Hierbei wird, ähnlich wie bei der Koronarangiographie, über einen Katheter reiner Alkohol in ein Herzkranzgefäß gebracht. Das vom Gefäß zu versorgende Myokardareal wird dadurch infarziert und geht zu Grunde. Die Effekte der Alkoholablation auf den Ausflussgradienten und die Besserung der Beschwerden sind wahrscheinlich mit der Myektomie vergleichbar (38, 72).

Der Benefit einer Implantation von 2-Kammerschrittmachern ist umstritten. Seine Indikation bei einer HCM ist nicht abschließend geklärt (90).

Im Endstadium der Erkrankung kann für einige Patienten die Herztransplantation indiziert sein (84, 136).

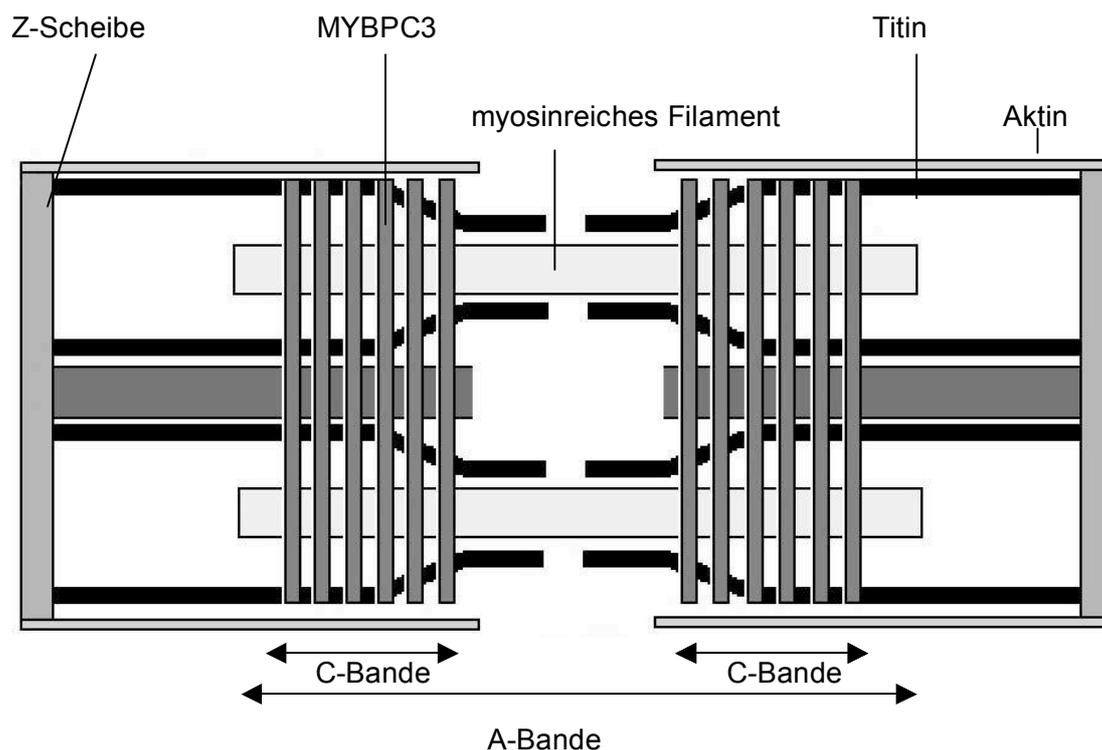
Die Prognose von Patienten mit HCM hängt von der Mutation, dem daraus resultierenden Phänotyp und der Therapie ab. Es sind Krankheitsverläufe mit Tod durch SCD trotz Therapie möglich. Ebenso ist bei Patienten eine uneingeschränkte Lebenserwartung beobachtet worden (85).

## 1.8 Aufbau des Sarkomers und Kontraktionszyklus

Die HCM ist eine Erkrankung des Sarkomers (69). Das Sarkomer stellt in den Kardiomyozyten wie in der Skelettmuskulatur den kontraktilem Apparat der Zelle dar. Im Sarkomer befindliche Myofilamente greifen ineinander und sind befähigt, durch Gleitbewegungen eine Verkürzung der Muskelfasern zu bewirken (Kontraktion).

Zwei Arten von Myofilamenten werden unterschieden. Eines der Filamente ist v. a. reich an dem Protein Myosin. Es hat einen Durchmesser von ungefähr 10 nm. Das andere Filament ist mit einem Durchmesser von ca. 5 nm dünner. Sein Hauptbestandteil ist das Protein Aktin (11).

Abb. 1.8 zeigt, wie die Filamente im Sarkomer positioniert sind.



**Abb. 1.8 Schematischer Aufbau des Sarkomers:** Die dicken und dünnen Filamente liegen parallel zueinander. Bei einer Muskelkontraktion bewegen sich die Z-Scheiben aufeinander zu, wenn sich die dünnen Filamente, die reich an Aktin sind, zur Sarkomermittle bewegen (engl. *sliding filament theory*). Die Myosinmoleküle der dicken Filamente stehen dabei zeitweise mit mehreren globulären Anteilen (Myosinköpfchen) mit Aktin in Verbindung. Die Länge der A-Bande verkürzt sich bei der Kontraktion nicht. Zur Bedeutung und Anordnung des MYBPC3 s. a. Kapitel 1.9. Abb. nach Oakley et al. modifiziert (111).

Vor Beginn der Kontraktion kommt es im Sarkomer zu einer Erhöhung des intrazellulären Kalziumionen-Spiegels. Die Ionen binden an Troponin C, einen weiteren Bestandteil der dünnen Filamente. Seine Bindung bewirkt eine Konformationsänderung von Tropomyosin. Tropomyosin ist ein regulatorisches Protein, das durch Konformationsänderung eine Bindungsstelle für die Myosinköpfechen auf Aktinmolekülen freigibt. Die Köpfechen führen nach der Bindung an Aktin eine Drehbewegung aus und bewegen so die dünnen Filamente zur Sarkomermitte. Durch zyklisches Lösen und Binden von Aktin und Myosin kommt es zur Filamentbewegung und damit zur Veränderung der Sarkomerlänge. Die Muskelzelle verkürzt sich dabei. Die Ruderbewegung und das anschließende Lösen der Myosin-Aktinbindung sind von einer ATP-Spaltung abhängig (11, 117).

Neben den genannten Strukturen gibt es weitere Proteine, die wichtig für Strukturertalt und Kraftentwicklung in der Muskelzelle sind. Studienergebnisse zeigen, dass auch das MYBPC3 eine solche Rolle übernimmt. Seine Funktion ist indessen noch nicht vollständig geklärt (41, 151).

### **1.9 Struktur und Funktion des Myosinbindungsproteins**

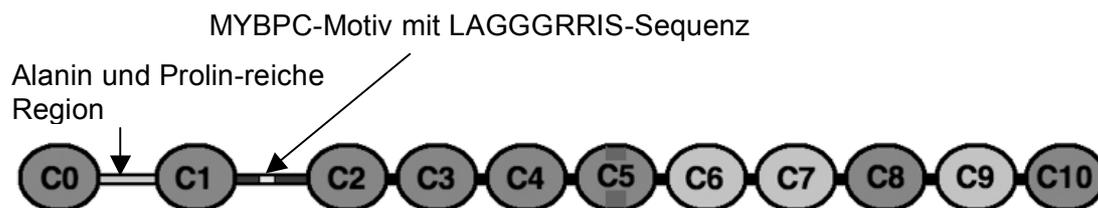
Das Myosinbindungsprotein ist als Bestandteil des Sarkomers mit den dicken Filamenten assoziiert. Es gibt drei Isoformen des MYBPC. Zwei von ihnen (MYBPC1 und MYBPC2) liegen in schnellen und langsamen Muskelzellen der Skelettmuskulatur. Das MYBPC3 ist herzspezifisch; es findet sich beim Menschen nur in Kardiomyozyten.

Alle drei Proteine werden von eigenen Genen auf unterschiedlichen Chromosomen kodiert (41).

Als ein Bestandteil der dicken Filamente liegen die MYBPC-Moleküle als regelmäßig verlaufende quere Streifen in den A-Banden des Sarkomere. Der Bereich, in dem die MYBPC an den dicken Filamenten angeordnet sind, wird C-Bande genannt. Nur ein Teil der Myosinmoleküle liegt im Kontaktbereich mit dem MYBPC, s. a. Abb. 1.8 (41, 111, 112, 141).

Die Struktur des MYBPC3-Moleküls setzt sich aus 11 globulären Domänen zusammen. Acht dieser Domänen sind Igl-ähnliche Proteine, die übrigen sind Fibronectin-Domänen. Die Struktur des MYBPC3 enthält Elemente, die sich bei den Isoformen der Skelettmuskulatur nicht finden (30, 41).

Die Struktur des MYBPC3 und seine kardiospezifischen Elemente sind in Abb. 1.9 dargestellt.



**Abb. 1.9 Aufbau des MYBPC3 mit seinen 11 Domänen:** Die Domänen C6, C7 und C9 sind Fibronectin-Domänen. Die übrigen sind Igl-ähnliche Domänen. Die Domänen sind über Aminosäureketten verbunden. Von den anderen Isoformen unterscheidet sich das MYBPC3 durch eine Region am N-terminalen Ende. So findet sich die Domäne C0 nur in Kardiomyozyten. Die Alanin und Prolin-reiche Region zwischen C0 und C1 in dieser Länge sowie die Aminosäuresequenz LAGGRRIS im MYBPC-Motiv sind ebenfalls nur im MYBPC3 zu finden. Auch eine Schleife aus 28 Aminosäuren in der Domäne C5 ist kardiospezifisch. Abb. modifiziert nach Flashman et al. (41).

Dem MYBPC3 wird eine komplexe Rolle beim Strukturerhalt und der Regulation der Kontraktionskraft in den Kardiomyozyten zugeschrieben.

Mäuse, denen die homozygoten Gene für das MYPBC3 außer Kraft gesetzt wurden („Knock out-Mäuse“), waren lebensfähig. Ihr Myokard jedoch war hypertrophiert. Die elektronenmikroskopische Untersuchung ihrer Kardiomyozyten zeigte neben dem für eine HCM typischen „*myocyte disarray*“ und einer Fibrose eine grundsätzlich intakte Sarkomerstruktur mit teils fehlerhafter Myofibrillenordnung (56). Dazu passt die Beobachtung, dass MYBPC an LIM-Proteine bindet. Fehlen diese Proteine, ist der Sarkomeraufbau verändert (49). Es wird daher angenommen, dass dem MYBPC zusammen mit weiteren Faktoren eine Funktion bei der Zusammensetzung der korrekten Sarkomerstruktur zukommt (41).

Experimentell konnte gezeigt werden, dass die Domänen C9 und C10 in der Lage sind, Bindungen mit Titinmolekülen einzugehen (41, 43). Bindungen mit Myosinstrukturen konnten an zwei Stellen nachgewiesen werden. So soll die C10-Domäne an sog. leichtes Meromyosin binden (113). Zudem ist das MYBPC-Motiv zwischen den Domänen C1 und C2 in der Lage, an das Subfragment S2 von Myosin zu binden. Das Subfragment liegt in der Nähe des Myosinköpfchens (41, 51). Durch Aufheben der Bindung zwischen dem Subfragment S2 und dem MYBPC3 kommt es zu einer erhöhten Kalziumsensitivität des Sarkomers und einer Zunahme der Kontraktionskraft (41, 43).

Die Bindung mit dem Subfragment S2 wird durch Phosphorylierung im Bereich des MYBPC3-Motivs aufgehoben. Die Phosphorylierung erfolgt durch eine cAMP abhängige Proteinkinase, die durch  $\beta$ -adrenerge Agonisten aktiviert werden kann (52). Die Dephosphorylierung kann durch eine Phosphatase nach Stimulation durch cholinerge Agonisten erfolgen (41).

Es wird vermutet, dass das MYBPC3 in der Lage ist, über Beeinflussung der Aktin-Myosinbrückenbildung, Einfluss auf die Kraftentwicklung zu haben. Das Protein wirkt dabei wie eine Bremse auf einige Myosinköpfchen (41). Weitere Versuche deuten daraufhin, dass Strukturen am N-terminalen Ende des Proteins durch zusätzliche Wirkung auf dünne Filamente einen beeinflussenden Effekt auf den Frank-Starling-Mechanismus ausüben (61).

### **1.10 Beziehung zwischen Genotyp und Phänotyp**

Mutationen in Genen der  $\beta$ -MHC und des MYBPC3 sind die häufigsten Ursachen einer HCM. Die meisten der Mutationen im Gen des MYBPC3 erzeugen dabei trunkierte Proteine (148). Das bedeutet, dass die bei der Translation synthetisierten Proteine unvollständig sind. Ihnen fehlen Aminosäuren am C-terminalen Ende des Proteins in variabler Anzahl.

Ursachen für solche trunkierten Proteine sind verschiedene Sequenzveränderungen im Gen des MYBPC3, die den Einbau eines vorzeitigen Stopcodons in die mRNA bewirken.

Der genaue Mechanismus, der Kardiomyozyten aufgrund mutierter Sarkomerproteine zur Hypertrophie veranlasst, ist nicht bekannt. Da die Mutationen der Gene wahrscheinlich sowohl kontraktionsfördernde als auch relaxationsfördernde Effekte ausüben, ist ein einheitlicher Pathomechanismus fraglich (9). Das Fehlen des MYBPC3 führt eher zu einer Zunahme der Verkürzungsgeschwindigkeit von Myozyten. Weil seine Funktion aber nicht genau verstanden ist, fehlt derzeit ein plausibles Modell zur Phänotypbildung (148).

Allgemein wird der Zusammenhang zwischen mutierten Sarkomergenen und der Ausbildung einer HCM in einer gestörten Kontraktion oder Relaxation gesehen. Durch die Störung wird das Herz zur Hypertrophie angeregt (41, 84).

### **1.11 Intronsche Varianten als Ursache eines Phänotyps**

Mutationen in Sarkomergenen, die eine HCM verursachen, betreffen v. a. Exons und direkte Übergänge zu Introns (engl. *intron-exon-boundaries*) (47). Exons machen einen Anteil von annähernd 1,1% des gesamten euchromatischen Chromatins beim Menschen aus. Der Anteil der Introns mit 24% ist deutlich größer (154). Introns stellen Nukleotidsequenzen dar, die sich zwischen den proteinkodierenden Exons eines Gens befinden. Nach der Transkription werden im Rahmen der sog. „Prozessierung“ die intronischen Sequenzen durch Spleißen aus der mRNA entfernt (133).

Es wird vermutet, dass die Ausprägung eines Phänotyps nicht nur von den proteinkodierenden Sequenzen eines Genoms abhängt, sondern wesentlich von der Regulation der Genexpression bestimmt wird (161). Die Regulation der Genexpression wird u. a. von Informationen, die in Introns enthalten sind, beeinflusst (96).

Eine Methode, regulatorisch bedeutsame Sequenzen in Introns ausfindig zu machen, ist der Sequenzvergleich von DNA unterschiedlicher Tierspezies. Durch einen solchen Vergleich kann gezeigt werden, dass Intronsequenzen

mit regulatorischer Funktion für alternatives Spleißen bei verschiedenen Spezies gleich oder sehr ähnlich sind. In diesem Zusammenhang wird dann von konservierter DNA gesprochen, weil davon ausgegangen wird, dass diese Sequenzen im Laufe der Evolution unter dem Selektionsdruck bewahrt wurden (67).

Ein anschauliches Beispiel für Veränderungen in intronischen DNA-Sequenzen, die zu einem pathologischen Phänotyp geführt haben, ist die präaxiale Polydaktylie. Die Erkrankung ist u. a. durch die Entwicklung eines zusätzlichen Fingers an der Daumenseite der Hand gekennzeichnet. Ursächlich für die Erkrankung ist eine Mutation in einem Intron des *Lmbr1*-Gens. Die Mutation betrifft eine Region in Intron 5, die regulatorische Aktivität auf ein entscheidendes Protein bei der Organogenese ausübt. Die Mutation bewirkt eine Überexpression des zu regulierenden Proteins.

Vergleiche der mutierten Intronsequenz im *Lmbr1*-Gen des Menschen mit anderen Tierspezies zeigte große Konservierung der Nukleotidfolge bis zum Kugelfisch Fugu. Es wird daher angenommen, dass die Mutation einen konservierten und damit funktionell bedeutsamen Bereich im Intron verändert (78).

### **1.12 Fragestellung**

Bis zum gegenwärtigen Zeitpunkt ist eine Vielzahl von Mutationen in Genen für Sarkomerproteine als Ursache einer HCM identifiziert worden. Das Gen des MYBPC3 ist besonders häufig betroffen (47).

Die Untersuchung von Erkrankten hat gezeigt, dass die Ausprägung der Phänotypen sehr heterogen ist. Selbst Träger derselben Mutation können sich phänotypisch voneinander unterscheiden.

Bislang sind als Ursache einer HCM veränderte Sarkomerproteine bekannt. Sie entstehen durch veränderte DNA-Sequenzen in kodierenden Exons. Zu ihrer Identifizierung wurden die Sequenzen der Exons bei betroffenen Patienten auf pathogene Mutationen untersucht. Auch die direkten Übergänge zwischen Introns und Exons wurden analysiert. Hier fanden sich teils veränderte Sequenzen, die normales Spleißen nicht erlauben.

Gegenwärtig gelingt es nur in höchstens 60% der Fälle bei Patienten mit HCM durch Screeningverfahren Mutationen in Exons oder im Bereich von Intron-Exon-Übergängen zu finden, die als ursächlich für die Erkrankung anzusehen sind (139). Daher ist es denkbar, dass in intronischen Genbereichen ein erheblicher Anteil von pathogenen Mutationen lokalisiert ist.

Mittlerweile ist bekannt, dass Introns eine wichtige Funktion bei der Genexpression übernehmen. Veränderungen von Intronsequenzen sind bei verschiedenen Erkrankungen nachweislich für die Entstehung pathologischer Phänotypen verantwortlich.

Mit dieser Arbeit soll der Frage nachgegangen werden, ob es Veränderungen in Introns des MYBPC3-Gens bei Patienten mit HCM gibt. Hierzu wurde die entsprechende DNA sequenziert.

Schließlich soll eine Antwort auf die Frage gefunden werden, welche Bedeutung eventuell gefundene Varianten in Introns des Gens für den Phänotyp einer HCM haben.

## **2. Material und Methoden**

### **2.1 Chemikalien**

In Tab. 2.1 sind die Chemikalien aufgeführt, die für die vorliegende Arbeit verwendet wurden. Die Chemikalien wurden zur weiteren Verwendung teils verdünnt oder als Bestandteil einer Lösungen verwendet; s. a. Kapitel 2 Lösungen und Ansätze.

<b>Chemikalie</b>	<b>Hersteller</b>
1:100 bp Größenstandard	Invitrogen
Acrylamid/Bis-Acrylamid 40% Stock Solution, 49:1	Sigma-Aldrich
Agarose-Pulver QA Agarose <sup>TM</sup> , molecular biology grade	QBiogene
Ammonium-Persulfat 10% (APS)	Merck
AmpliTaq Gold® PCR Master Mix	Applied Biosystems
Aqua Spüllösung	DeltaSelect
Borsäure >=99, 5%	Sigma-Aldrich
Eppendorf® Mastermix (2.5 x)	Eppendorf
Essigsäure 100%	Merck
Ethanol 10%	T. J. Baker
Formaldehyd mind. 36%	Riedel-deHaen
Formamid	Fluka
Glycerol 99%	Sigma
Loading Dye Solution	MBI Fermentas
Natriumcarbonat	Riedel-deHaen
Ladepuffer Nucleic Acid Sample Buffer 5x	Bio-Rad
NucleoSpin Extract II	Mackery-Nagel
Primer Resequencing Set RSS000020042 complete	Applied Biosystems
Salpetersäure 65%	Fluka
Silbernitrat	Caesar+Loretz GmbH
Sybr Green	Invitrogen

<b>Chemikalie</b>	<b>Hersteller</b>
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Sigma
Tritriplex III	Merck
Trizma®base, USP	Sigma

Tab. 2.1 Verwendete Chemikalien

## **2.2 Geräte**

In Tab. 2.2 sind die verwendeten Geräte aufgeführt.

<b>Gerät</b>	<b>Hersteller</b>
Biofuge pico	Heraeus instruments
DNA-Sequencer ABI Prism 3700	Applied Biosystems
Drucker P93	Mitsubishi
Agarosegelelektrophorese-System Agagel Maxi	Biometra
Erlenmeyerkolben 250 und 500ml	Schott
Falcon Tubes 2ml	Falcon
Glasschalen	Assistent
Messzylinder 250ml	Roth
Kühler für SSCP-Kammern Multitemp III	Pharmacia Biotech
Mikrowelle	Siemens
Monitor	Santec
Overheadfolien	Herlitz
PCR-Cooler für 96er Platten	Eppendorf
PCR MBS 0.2G	Hybaid Limited
Pipettier-Roboter Genesis® Freedom™	Tecan
Rotilabo®-Laborschalen	Roth
Rührgerät Big-Squid	Ika®
Rüttler SM-30 Control	Edmund Bühler
Rotilabo®-Magnetstäbchen, diverse Größen	Roth
Scanner SnapScan 310	AGFA
Sicherheitspipetierball	Roth

<b>Gerät</b>	<b>Hersteller</b>
SSCP-Elektrophoresesystem Multigel-Long	Biometra
<i>Touch down-PCR</i>	Hybaid
UV-Lichtkammer mit Fotoapparat	Vilber Lourmat
Voltmeter	Micro-Bio-Tec Brand
Vortex L 64	Labor Brand
Waage ScalTec SBA 61	ScalTec
Zentrifuge Rotanta 460 R	Hettich Zentrifugen

Tab. 2.2 Verwendete Geräte

### **2.3 Verbrauchsmaterialien**

In Tab. 2.3 sind die verwendeten Verbrauchsmaterialien aufgeführt.

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
96 MultiPLY® PCR-Platte, natur	Sarstedt AG &Co
Crystal QPCR-Film optical clear (Abdeckfolie)	Biolab Products
Handschuhe Peha-Soft, powderfree	Hartmann
Pipetten mit Fixvolumina 2, 5, 100 und 1000 µl	Eppendorf
Pipettenspitzen	Eppendorf
PP-PCR-Gefäß 0,2 ml	Greiner bio-one
Safe-Lock Tubes 1,5 ml	Eppendorf Biopur

Tab. 2.3 Verwendete Verbrauchsmaterialien

## **2.4 Lösungen und Ansätze**

Nachfolgend sind die Bestandteile der verwendeten Ansätze und Lösungen sowie ihre Mengen aufgeführt. Auf Besonderheiten bei der Herstellung von Ansätzen und Lösungen wird in den Kapiteln eingegangen, in denen ihre Verwendung beschrieben ist.

a) 10 x Tris-Borat-EDTA (TBE)

1221,1 g Trisbase  
61,8 g Borsäure  
7,4 g Tritriplex III  
1 L destilliertes Wasser

b) Agarosegel 1,4% konzentriert, 100 ml

1,4 g Agarose-Pulver  
100 ml entionisiertes Wasser

c) Basenpaar-Standard für Gelelektrophorese

8 µl 1:100 bp Größenstandard  
1 µl Sybr Green  
2 µl Loading Dye

d) Gelstocklösung für ein 10% PAA-Gel

7,5 ml Acrylamid/Bis-Acrylamid 49:1  
1,5 ml 10 x TBE  
30 µl TEMED  
21 ml steriles Wasser  
600 µl APS 10%

e) Stichproben-Ansatz zur Gelelektrophorese

- 4 µl PCR-Produkt
- 1,5 µl Loading Dye
- 1,5 µl Sybr Green I

f) SSCP-Ladepuffer

- 6 Teile Formamid
- 1 Teil 5 x Agarosegelladepuffer

g) Probenstandard für SSCP-PCR

- 6 µl Eppendorf® Mastermix (2.5 x)
- 4 µl DNA (20 ng/dl)
- 3,8 µl H<sub>2</sub>O
- 0,6 µl Forward-Primer
- 0,6 µl Reverse-Primer

h) Probenaufbereitung für SSCP-PCR

- 4 µl PCR-Produkt
- 6 µl Ladepuffer

## **2.5 Patienten**

Im Rahmen dieser Arbeit wurden DNA-Sequenzen des MYBPC3-Gens von 44 Patienten untersucht. Bei allen Patienten war in Vorarbeiten eindeutig eine HCM diagnostiziert worden (34). Es konnte bei diesen Patienten weder in Exons noch in Intron-Exon-Übergängen des MYBPC3-Gens eine Mutation als Ursache einer HCM diagnostiziert werden.

Fast alle Patienten zeigten echokardiographisch das Bild einer HCM-typischen Myokardhypertrophie, Zeichen einer linksventrikulären Dilatation waren nicht erkennbar. Weitere Ursachen einer Ventrikulhypertrophie, insbesondere Herzklappenfehler oder arterieller Hypertonus, wurden, weitest möglich, ausgeschlossen.

Echokardiographische Kriterien einer HCM wurden nicht bei denjenigen Patienten zur Diagnosestellung angewendet, die sich vor Studienbeginn einer kardialen Myektomie unterzogen hatten. Die Myektomie führt zu einer Reduktion der ventrikulären Muskelmasse. Deshalb kann postoperativ die echokardiographische Messung der Ventrikelwände normwertig sein, obwohl der Patient an einer HCM erkrankt ist.

Bei myektomierten Patienten wurde daher unabhängig vom Befund der Echokardiographie die Diagnose einer HCM gestellt, wenn die weiteren Befunde und präoperative Herzechomessungen für eine Erkrankung sprachen. Ebenso wurde bei Patienten mit Zustand nach TASH verfahren.

Alle Patienten wurden über die geplanten genetischen Untersuchungen aufgeklärt. Sie wurden darüber informiert, welche Aussagen sich anhand von DNA-Befunden möglicherweise über ihren Krankheitsverlauf machen ließen. Die Patienten gaben ihr Einverständnis zu den Untersuchungen. Die Zustimmung zu den Untersuchungen des Ethikrats der Charité, Campus Virchow Klinik, Humboldt Universität Berlin, lag vor Studienbeginn vor.

Die untersuchten Patienten unterscheiden sich hinsichtlich des Alters, der Symptome und des echokardiographischen Befundes voneinander. Die Patienten sind untereinander nicht verwandt.

Die Verteilung der Merkmale ist in Tab. 2.5 gezeigt. Die Tabelle zeigt auch Geschlecht und ethnische Herkunft der Patienten an. In Klammern ist die Anzahl (n) der Patienten mit dem jeweiligen Merkmal angegeben. Es lagen nicht von allen Patienten vollständige Datensätze vor.

Weiter wird in der Tabelle dargestellt, wie viele Patienten sich invasiven Eingriffen in Form einer Myektomie oder TASH haben unterziehen lassen. Diese Information soll dazu dienen, anzuzeigen, wie ausgeprägt der Phänotyp bei den Patienten war.

<b>Merkmal</b>	<b>Wert</b>
Anzahl der Patienten mit sequenziertem MYBPC3	44
Geschlecht (n=44)	14 weiblich, 30 männlich
Alter der Patienten zum Zeitpunkt der DNA-Isolation (n=44)	51 ±14 Jahre
Alter bei Manifestation der HCM (n=37)	37 ±12 Jahre
Dicke des Interventrikularseptums (IVS) (n=44)	20 ±5 mm <12 mm=normwertig (40)
Dicke der Hinterwand (HW) (n=29)	13 ±3 mm <12 mm=normwertig (40)
enddiastolischer Diameter des linken Ventrikels (LVEDD) (n=38)	46 ±5 mm <55 mm=normwertig (40)
Anamnese mit Dyspnoe, Angina pectoris, Schwindel und/oder Palpitationen (n=36)	92% positive Anamnese 8% negative Anamnese
Positive Familienanamnese (n=39)	in 61% der Fälle
ethnische Herkunft der Patienten (n=44)	9 türkische, 35 deutsche Patienten
Anzahl an Myektomien oder TASH (n=35)	in 46% der Fälle

**Tab. 2.5 Merkmale der untersuchten Patienten mit einer HCM:** Die Angaben des Alters und der Echokardiographie sind Mittelwerte. Die Streubreiten sind mit der Standardabweichung angegeben. Eine Patientin war zum Zeitpunkt der Manifestation und bei Diagnose zwei Jahre alt. Ihre Daten wurden bei der Berechnung von Alter und Manifestationszeitpunkt wegen der dann gegebenen Ergebnisverzerrung nicht berücksichtigt.

## **2.6 DNA-Gewinnung**

Die DNA, die zur Sequenzanalyse benötigt wurde, war in den erwähnten Vorarbeiten bereits aus kernhaltigen Zellen venösen Blutes der Patienten isoliert worden (34). Das Verfahren zur Isolierung der DNA ist bei Erdmann et al. beschrieben (37). Ziel einer solchen Isolierung ist es, genomische DNA aus Zellkernen zu gewinnen. Genomische DNA ist die DNA, die alle Erbinformationen eines Organismus trägt.

## **2.7 DNA-Amplifikation und Polymerase-Kettenreaktion**

Für eine Sequenzanalyse bestimmter DNA-Abschnitte der genomischen DNA ist es erforderlich, die zu untersuchenden Abschnitte in ausreichender Menge vorliegen zu haben. Um solche Mengen zu erhalten, müssen spezielle Verfahren der Vervielfältigung (Amplifikation) eingesetzt werden.

Für diese Arbeit wurde zur Amplifikation die Polymerasekettenreaktion (engl. *polymerase chain reaction*, PCR) eingesetzt. Die PCR wurde Mitte der 1980er Jahre von Mullis entwickelt. Sie ist ein Verfahren, das mit Hilfe thermostabiler Polymerasen DNA vervielfältigt (79). Mittlerweile hat die PCR sich als Standardverfahren in der Sequenzanalyse von DNA etabliert (104).

Zur Amplifikation mit der PCR werden Primer verwendet, die als Oligonukleotide an die Einzelstränge der Ziel-DNA binden und als Startpunkt für die Polymerasen zur Synthese von DNA in zwei Richtungen dienen. Für die Amplifikation des MYPBC3-Gens wurde ein fertiger Satz von Primer-Paaren der Firma Applied Biosystems verwendet (Resequencing Set RSS000020042, RSS Version 01). Das Set enthält 36 Primer-Paare. Die Primer-Paare ermöglichen die Amplifikation von ca. 60% der gesamten Gensequenz.

Die Probenansätze für die PCR wurden im wesentlichen dem Protokoll „VariantSEQr™ and mitoSEQr™ Resequencing Systems“ der Firma Applied Biosystems folgend zusammengestellt (3). Nachdem sich in Vorversuchen die

empfohlene Menge von 10 µl pro Probenansatz als zu gering für eine Sequenzierung herausgestellt hatte, wurde der Ansatz auf 25 µl erhöht. Die Zusammensetzung der Probenansätze ist in Tab. 2.7a gezeigt.

Reagenz	Menge [µl]
AmpliTaq Gold ® PCR Master Mix	13,88
steriles, entionisiertes Wasser	1,11
Glycerol auf 50% verdünnt	4,44
Primerpaare aus dem Set	5,55
Gesamtvolumen	25

**Tab. 2.7a Komponenten für ein Volumen von 25 µl je Probe:** Der Primermix enthält Forward- und Backward-Primer.

Die in Tab. 2.7a genannten Komponenten wurden nach dem Zusammenbringen mit dem Vortex-Gerät gemischt. Anschließend wurden sie auf die Pipettierplatten in einer Menge von jeweils 25 µl gegeben. In den Reagenzbehältnissen der Platten befanden sich bereits 10 µl Patienten-DNA in einer Konzentration von 20 ng/µl. Die DNA war zuvor mit Hilfe des Pipettier-Roboters aufgetragen und eingetrocknet worden. Bestimmte Positionen auf der Pipettierplatte waren anstelle von DNA mit Wasser gefüllt. Es sollte in diesen Ansätzen kein PCR-Produkt erscheinen. Die Ansätze mit Wasser dienten der Kontrolle des Pipettierens.

Nach einer Zentrifugation der gefüllten PCR-Platten wurde die Amplifikation mit der PCR-Reaktion gestartet. Tab. 2.7b zeigt die Reaktionsschritte der PCR-Reaktion, wie sie für die Primerpaare des Primer-Sets verwendet wurden.

Schritt	Vorgang	Temperatur [° C]	Dauer [sec]
1	Aktivierung	96	350
2	Amplifikation	94	30
		60	45
		72	45
3	Abschlussamplifikation	72	600
4	Halten	4	bis zu Entnahme

**Tab. 2.7b Ablauf der PCR-Reaktionen:** Schritt 2 wurde insgesamt 40 mal wiederholt, damit ausreichend Amplifikat entstehen konnte. Ergab eine PCR-Reaktion nicht ausreichend DNA-Produkt, wurde die Zahl der Amplifizierungszyklen schrittweise auf bis zu 45 Zyklen erhöht.

## 2.8 Gelelektrophorese

Eine Gelelektrophorese wurde im Anschluss an jede PCR durchgeführt. Sie diente dazu, Größe und Menge der amplifizierten DNA abzuschätzen.

Bei einer Gelelektrophorese kann DNA in Abhängigkeit von ihrer Größe und Ladung in einem Agarosegel, das sich in einem elektrischen Feld befindet, aufgetrennt werden.

Zur Gelherstellung wurden die Komponenten für ein Agarosegel in einem Erlenmeyerkolben gemischt und in der Mikrowelle bei maximaler Temperatur zum Sieden gebracht. Unter gelegentlichem Schwenken wurden die Komponenten bis zum Lösen aller Partikel gekocht. Anschließend wurde das flüssige Gel unter ständigem Rühren auf ungefähr 37° C abgekühlt. Es wurde dann in Gel-Formen des Elektrophoresesystems gegossen, in denen sich Kämme zur Taschenbildung befanden. Bis zu seiner weiteren Verwendung musste das Gel ungefähr zwei Stunden bei Raumtemperatur (RT) aushärten.

Nach jeder PCR-Reaktion wurden Stichproben von 4 µl aus dem Reaktionsgemisch der Platten entnommen. Die Proben wurden für die Gelelektrophorese mit Loading Dye und Sybr Green aufbereitet. Die aufbereiteten Stichproben-Ansätze und ein 100 bp-Standard wurden in die Taschen des ausgehärteten Gels gefüllt. Das Gel befand sich dabei in der mit 0,5 x TBE

gefüllten Elektrophoresekammer. Nach dem Befüllen der Taschen wurde eine Spannung von 112 mV über 40 min an die Kammer angelegt.

Nach Ablauf der Zeit erfolgte die Beurteilung unter UV-Licht. In den Gelen stellte sich eine ausreichende Menge Amplifikat in Form von deutlich leuchtenden Banden dar. Die Größe der DNA-Produkte wurde durch Vergleich der Banden mit dem Standard abgeschätzt. War das Ergebnis der Gelelektrophorese zufriedenstellend, lagerten die PCR-Produkte bei +4° C bis zur Sequenzierung.

## **2.9 Aufreinigung und Sequenzierung der Proben**

Die PCR-Produkte wurden zur Sequenzierung an das Institut für Molekulare Genetik in Berlin geschickt. Dort wurden die Proben aufgereinigt. Die Aufreinigung diente der Entfernung von überschüssigen Molekülen in Proben. Derartige Moleküle können Störsignale erzeugen und die Qualität der Sequenzierungsergebnisse beeinflussen.

Die Sequenzierung erfolgte mit einem DNA-Sequenziergerät der Firma Applied Biosystems (ABI Prism 3700).

Einzelne DNA-Sequenzen waren nach der Sequenzierung in Berlin nicht auswertbar. Eine PCR für diese Sequenzen wurde wiederholt. Die erneute Aufreinigung erfolgte dann mit dem NucleoSpin Extract II-Sets von Mackery-Nagel. Dabei wurde der Anleitung des Herstellers folgend vorgegangen. Die erneute Sequenzierung der Fragmente wurde von der Firma SeqLab in Göttingen vorgenommen. Zur Sequenzierung wurde dasselbe Gerätemodell wie in Berlin verwendet.

## **2.10 Auswertung der Sequenzen**

Die Ergebnisse der Sequenzierung wurden in Form von Elektropherogrammen als Computerdateien im .ab1-Format übermittelt. Die Elektropherogramme wurden mit dem Computerprogramm FinchTV (Version 1.4.0) der Firma Geospiza Inc untersucht (48).

Zur Interpretation der Elektropherogramme, s. Kapitel 3.3 Sequenzanalyse.

## **2.11 Single-Stranded Conformation Polymorphism-Analyse**

Die Einzelstrang-Konformationspolymorphismus-Analyse (engl. *single-stranded conformation polymorphism-Analyse*, SSCP) ist ein Verfahren, das es ermöglicht, Unterschiede in der Sequenzfolge von DNA-Einzelsträngen im Vergleich zu anderer DNA sichtbar zu machen.

Einzelstrang-DNA nimmt in Abhängigkeit von ihrer Nukleotidsequenz und der Temperatur bestimmte Konformationen an. Diese räumliche Anordnung der Nukleotide bestimmt das Wanderungsverhalten der DNA in einem Gel innerhalb eines elektrischen Spannungsfeldes (103). Von den Proben wurde deshalb zunächst eine SSCP bei Raumtemperatur und +4° C durchgeführt. Weitere Versuche erfolgten unter den Temperaturbedingungen, unter denen die jeweilige Variante am deutlichsten dargestellt war.

Einzelne DNA-Sequenzen der Patienten mit HCM zeigten im Vergleich zu der Referenzsequenz Unterschiede in der intronischen Nukleotidabfolge. Diese DNA-Sequenzen wurden mittels SSCP mit DNA gleicher Position von 218 Probanden verglichen. Bei diesen Probanden war bislang keine Diagnose einer HCM gestellt worden.

In Tab. 2.11 sind die Daten der Probanden aufgeführt, bei denen sich keine HCM nachweisen ließ.

<b>Merkmale</b>	<b>Werte</b>
Anzahl der Patienten für SSCP-Vergleich (n=218)	218
Alter (n=218)	53 ±14 Jahre
BMI (n=215)	26 ±4 kg/m <sup>2</sup>
systolischer Blutdruck (n=218)	135 ±21 mm/Hg
diastolischer Blutdruck (n=218)	78 ±12 mm/Hg
linksventrikuläre Masse (n=171) (< 100-132 g/m <sup>2</sup> ) (40)	82 ±18 g/m <sup>2</sup>
IVS (n=171) (<12 mm=normwertig) (40)	10 ±2 mm
HW (n=171) (<12 mm=normwertig) (40)	8 ±1 mm
LVEDD (n=171) (< 55 mm=normwertig) (40)	48 ±4 mm

**Tab. 2.11 Ausgewählte echokardiographische Merkmale, die zum Ausschluss einer HCM überprüft wurden:** Die Werte sind Mittelwerte aller Patienten. Die Streubreiten sind mit der Standardabweichung angegeben. Die Werte der Echokardiographie liegen im Mittel im Normbereich.

Für eine SSCP werden kurze DNA-Abschnitte, die die Variante einer Sequenz beinhalten, in einer PCR-Reaktion amplifiziert. Die amplifizierten Stränge werden anschließend denaturiert, so dass das Erbmateriale als Einzelstrang vorliegt. Es folgt eine Elektrophorese der Stränge in einem PAA-Gel. Mit Hilfe einer Silberfärbung können die gewanderten Einzelstränge sichtbar gemacht werden.

## 2.12 Probenansatz für SSCP-PCR

Für die SSCP wurden Abschnitte des MYBPC3-Gens, die eine intronische Variante enthielten, mit PCR amplifiziert. Entsprechende Primer wurden mit dem Computerprogramm Primer 3 Input ausgewählt (123). Die Firma BioTez Berlin-Buch GmbH lieferte die Primer. Tabelle 2.12 zeigt die Sequenzen der Primer.

Intron im MYBPC3	Primersequenz	Größe der PCR- Produkte
11(a)	F: TGC CCA ACA TAG CAC AGC A	
	R: CCA GGA CCA AGG AGC TGT AG	184 bp
11(b)	F: GTG GCT ACA GCT CCT TGG TC	
	R: ATG CGC TCG TAC TCA GAT GG	168 bp
31	F: GAG GTG CGA GGT GAG GAG	
	R: GAG GCA CTG CAG AAG AGG AG	206 bp

**Tab 2.12 Primersequenzen für die PCR mit anschließender SSCP:** Mit F sind die Forward-, mit R die Reverse-Primer gekennzeichnet. In der ersten Spalte ist das Intron genannt, in dem sich die Variante befindet. In Intron 11 lagen zwei Varianten vor. Die Fragmente sind mit (a) und (b) gekennzeichnet.

Die Primer wurden für eine 100 µmolare Lösung entsprechend der Anleitung der Lieferfirma in sterilem Wasser gelöst. Anschließend wurde eine 1:10 Verdünnung der Lösung hergestellt. In der Verdünnung wurden die Primerpaare zum Probenansatz für die PCR gegeben. Mittels *Touch down*-PCR wurden geeignete Annealing-Temperaturen für die Primerpaare ermittelt. Das Gelingen der PCR-Reaktion wurde durch die oben beschriebene Gelelektrophorese überprüft.

### **2.13 PAA-Gele**

Für das Gel zur SSCP wurde eine Gelstocklösung für PAA-Gele hergestellt. Die Polymerisation der Gelstocklösung erfolgte durch Zusatz von 600 µl APS 10%. Im noch flüssigen Zustand wurde die Lösung zwischen die Glasplatten des Elektrophoresesystems gegossen. Die Platten waren dabei mit Klammern fixiert. Zur Bildung von Pipettiertaschen wurden Käbme eingefügt. Nach ca. einer Stunde war die Lösung ausgehärtet.

Das ausgehärtete Gel wurde in die SSCP-Kammern gebracht. Die Kammern wurden mit 0,5 x TBE als Elektrophoresepuffer befüllt. Bevor die Proben in die Taschen gefüllt wurden, wurde für 30 min eine Spannung von 55 V angelegt.

Die Denaturierung der intronischen DNA erfolgte bei +95° C für 10 min. Eine erneute Bindung der Einzelstränge wurde verhindert, indem die Proben unmittelbar nach der Denaturierung gekühlt wurden.

Die nun in Einzelstrangkonnformation vorliegenden DNA-Stränge wurde mit einem 1:100 bp-Standard in die Taschen des Gels pipettiert.

Ein Ausschwemmen der Proben aus den Taschen wurde verhindert, indem für 30 min bei einer Spannung von 120 V die Proben rasch in das Gel einzogen. Dann wurden eine Spannung für ungefähr 15 Stunden von 55 V angelegt.

Nach SSCP folgte die Silberfärbung zur Darstellung der DNA-Banden.

### **2.14 Silberfärbung**

Um die DNA im Gel sichtbar zu machen, wurden die Banden nach der Elektrophorese mit Silber gefärbt. Es wurde eine abgewandelte Variante der Silberfärbung nach Budowle et al., wie nachfolgend beschrieben, durchgeführt (14).

Nach der Elektrophorese wurden die Gele aus den Glaskammern herausgelöst und in Ethanol 10% für 10-15 min mit Hilfe des Rüttlers

geschwenkt. Dieser Schritt sollte ein Ausschwemmen der DNA aus dem Gel bei den folgenden Reaktionen verhindern. Die Gele wurden anschließend für 30 sec in Salpetersäure zur Einstellung eines sauren pH-Wertes geschwenkt. Durch Schwenken in Silbernitrat (200 ml) und Formaldehyd (250 µl) konnten die Silberionen an die DNA binden. Überschüssige Silberionen wurde durch mehrfaches Waschen mit Spülwasser aus den Gelen entfernt. Die Banden wurden nach einem Bad mit Natriumcarbonat (1000 ml) und Formaldehyd (800 µl) sichtbar gemacht. Durch diesen Schritt wurden die Silberkomplexe, die an DNA gebunden hatten, reduziert. Die Banden waren nach diesem Schritt erkennbar. Die Fixierung der gefärbten Banden erfolgte durch Baden in Essigsäure 10% für mindestens 10 min.

Zur Archivierung wurden die Gele zwischen Overheadfolien gelegt, eingescannt und als Graphikdatei im Computer gespeichert.

## **2.15 Homologievergleich mittels BLAT**

Die intronischen DNA-Sequenzen des MYBPC3, bei denen sich eine Variante fand, wurden in einer DNA-Datenbank nach gleichen und sehr ähnlichen Sequenzen anderer Spezies durchsucht.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde hierzu das Programm Human Basic Local Alignment Search Tool (BLAT) von UCSC Genome Bioinformatics benutzt (68). Das Programm ist im Internet verfügbar (152). Es vergleicht nach Eingabe einer DNA-Sequenz von bis zu 25.000 bp zunächst, welchem Gen des Menschen die Sequenz am wahrscheinlichsten zuzuordnen ist. Anschließend wird der Abschnitt desselben Gens mit Sequenzen von 27 Wirbeltieren verglichen.

Übereinstimmungen in der Sequenz verschiedener Spezies werden graphisch mittels eines Kurvenverlaufs als Konservierung dargestellt. Die Höhe der Kurve gibt das Maß der Konservierung an. Als View-Range wurde 0 bis 1 eingestellt, so dass auch Bereiche mit minimaler Konservierung

dargestellt werden.

Die Berechnung der Homologie für den Kurvenverlauf erfolgte durch das integrierte Programm PhasCons. Seine Funktion ist bei Siepel et al. beschrieben (137).

## **2.16 Statistische Verfahren**

Um die in dieser Arbeit ermittelte Häufigkeit von Allelen für eine Population zu errechnen, wurde das Hardy-Weinberg-Gesetz angewendet. Dieses Gesetz ist geeignet, Allelfrequenzen in einer idealen Population zu ermitteln. Eine ideale Population ist unendlich groß. In ihr findet keine Selektion statt.

Die Häufigkeit aller Allele in der Population wird nach Hardy und Weinberg durch folgende Formel beschrieben:  $p^2 + 2pq + q^2 = 1$ . Dabei entspricht 1 der Gesamtheit aller Allele (100%). Die Unbekannten p und q symbolisieren hier jeweils ein Allel:  $p^2$  entspricht dem homozygoten Allel AA,  $q^2$  dem homozygoten Allel BB, und  $2pq$  steht für die heterozygoten Allele AB und BA.

Der  $\chi^2$ -Test (Chi-Quadrat-Test) nach Pearson wurde verwendet, um zu überprüfen, ob die beobachteten und nach Hardy und Weinberg ermittelten Werte der Allelfrequenz sich in ihrer Häufigkeit signifikant unterscheiden. Werte für  $p < 0,05$  werden dabei als signifikant angesehen.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Auswertung der Gelelektrophorese

Eine Gelelektrophorese wurde im Anschluss an jede PCR mit Stichproben einzelner Ansätze durchgeführt. Mit ihrer Hilfe konnte noch vor der Sequenzierung sichtbar gemacht werden, ob die PCR-Reaktion zu einem Produkt in erwarteter Größe geführt hatte. Die Leuchtstärke der Banden ließ abschätzen, wie viel Produkt entstanden war. Sichtbare Banden sollten nicht in den mit Wasser gefüllten Leerproben erkennbar sein. Anderenfalls wäre von einer Kontamination der Proben durch falsches Pipettieren auszugehen. Im Falle einer Kontamination wurden alle Ansätze dieser PCR-Reaktion verworfen. Die PCR wurde wiederholt.

Zeigte die Elektrophorese nur schwache Banden, wurden die PCR-Bedingungen optimiert, bis ein gutes Ergebnis sichtbar wurde.

Abb. 3.1 zeigt das Bild eines Gels unter UV-Licht nach erfolgter Elektrophorese mit zwei Primerpaaren des Resequencing Sets.



← Banden bei ca. 300 bp

← Banden bei ca. 600 bp

**Abb. 3.1 Gel unter UV-Licht:** In der Bildmitte ist in Form übereinanderliegender Banden der 1:100 bp-Standard erkennbar. Rechts von ihm zeigen sich kräftige Banden als Ausdruck einer PCR-Reaktion, bei der eine große Menge DNA amplifiziert wurde. Das PCR-Produkt hat eine erwartete Größe ca. 317 bp. Im Vergleich dazu lieferte die PCR-Reaktion des anderen Primerpaares mit der DNA weniger Produkt. Dies wird an den schwächer leuchtenden Banden erkennbar. Die PCR wurde daher mit einer höheren Zahl an Amplifikationszyklen wiederholt. Dieses Produkt hat eine erwartete Größe von etwa 604 bp.

### **3.2 Ergebnisse der SSCP**

Die Ergebnisse der SSCP mit anschließender Silberfärbung sind bei den Ergebnissen der Sequenzierung gezeigt.

### **3.3 Sequenzanalyse**

Die aus Berlin übermittelten Ergebnisse der Sequenzierung wurden als Elektropherogramme am Computer ausgewertet. Es fanden sich bei 44 Patienten insgesamt 47 verschiedene Varianten im Gen für das MYBPC3 im Vergleich zu der Referenzsequenz, die im Programm *CHIP* des Children's Hospital Boston angegeben ist (17). 20 dieser Varianten liegen in Exons des Gens. Die übrigen 27 Differenzen betreffen Introns.

Jeder Patient hatte mindestens eine Abweichung in seiner Gensequenz gegenüber der Referenzsequenz. Die meisten Patienten waren Träger mehrerer Varianten.

20 der insgesamt 1584 Fragmente konnten trotz wiederholter PCR mit anschließender Sequenzierung wegen unzureichender Signalstärke nicht ausgewertet werden. Die PCR mit dem Primerpaar RSA 000989563 zeigte auch nach wiederholter PCR kaum auswertbare Elektropherogramme. Das Primerpaar deckt das kurze Exon 7 (Größe: 49 bp) und Exon 8 (Größe: 30 bp) sowie flankierende Intronanteile ab.

Tab. 3.3 gibt einen Überblick über die gefundenen Sequenzunterschiede.

Genomische Position	Position im MYPBC3	Position in cDNA	Position im Protein	MAF	Status
g.-224 g>del	5' -200 del(g)	-	-	1.0	neu
g.839 C>T	Intron 2 -303 C/T	-	-	0.01	neu
g.1449 G>C	Intron 2 +41 G/C	-	-	0.03	(17)
g.2355 A>del	Intron 4 -180 del(A)	-	-	0.76	neu
g.2600 G>A	Exon 4 G/A	c.504 G>A	p.V158M	0.02	(1)
g.2620 C>T	Exon 4 C/T	c.524 C>T	p.G164G	0.02	(17)
g.2741 C>del	Intron 5 -12 del(C)	-	-	0.79	neu
g.2756 C>T	Exon 5 C/T	c.569 C>T	p.A179A	0.01	(17)
g.3068 C>T	Intron 5 +195 C/T	-	-	0.04	(17)
g.4157 A>G	Exon 6 A/G	c.738 A>G	p.S236G	0.08	(1, 34)
g.4755 C>T	Exon 7 C/T	c.818 C>T	p.T262T	0.02	(34)
g.4989 C>T	Exon 8 C/T	c.876 C>T	p.R282W	0.01	(34)
g.6045 C>A	Intron 10 +25 C/A	-	-	0.03	(17)
g.6166 G>T	Intron 11 -111 G/T	-	-	0.01	neu
g.6275 A>G	Intron 11 -2 A/G	-	-	0.02	(110)
g.6282 C>A	Exon 11 C/A	c.964 C>A	p.S311X	0.01	neu
g.6327 G>A	Exon 11 G/A	c.1009 G>A	p.R326Q	0.05	(91)
g.6378 C>del	Exon 11 del(C)	c.1060 C>del	p.T343X	0.01	(34, 36)
g.9436 T>C	Intron 13 -63	-	-	0.01	(17)
g.9718 insC	Exon 14 ins(C)	c.1388 ins(C)	p.P452X	0.01	neu
g.13034 A>T	Intron 19 +38 A/T	-	-	0.06	(34)
g.13114 A>G	Intron 19 +118 A/G	-	-	0.70	(17)
g.13131 insGAGACTT	Intron 20 -123. insGAGACTT	-	-	0.01	neu
g.14145 C>G	Intron 21 +18 C/G	-	-	0.09	(34)
g.14220 C>T	Intron 21 +94 C/T	-	-	0.01	(17)
g.14244 G>A	Intron 21 +117 G/A	-	-	0.01	(17)
g.14729 TC>del	Intron 22 -123 del(TC)	-	-	0.09	neu
g.14917 insG	Exon 22 ins(G)	c.2403 ins(G)	p.W791X	0.01	(1)
g.15152 C>T	Exon 23 C/T	c.2527 C/T	p.A833V	0.01	(1)
g.15201 C>T	Exon 23 C/T	c.2576 C/T	p.V848V	0.09	(17)
g.16782 C>T	Intron 24 +12 C/T	-	-	0.14	(34)

Genomische Position	Position im MYPBC3	Position in cDNA	Position im Protein	MAF	Status
g.17028 C>T	Intron 24 +258	-	-	0.18	(17)
g. 17328 T>A	Intron 25 -110	-	-	0.4	(17)
g. 17570 C>G	Exon 25 C/G	c.2899 C/G	p.T956S	0.01	neu
g.17640 A>G	Intron 25 +35 A/G	-	-	0.02	(17)
g.19024 insAA	Exon 27 ins(AA)	c.3154 ins(AA)	p.T1041X	0.02	(110)
g.19039 G>del	Exon 27 del(G)	c.3168 del(G)	p.V1046X	0.01	(36)
g.19166 A>G	Intron 27 +76 A/G	-	-	0.01	(17)
g.19293 A>G	Intron 28 -21 A/G	-	-	0.12	(34)
g.19359 G>del	Exon 28 del(G)	c.3265 del(G)	p.G1078X	0.01	neu
g.19411 G>A	Exon 28 G/A	c.3317 A/G	p.E1095E	0.36	(34)
g.20130 C>T	Intron 30 +49 C/T	-	-	0.16	(34)
g.20295 G>A	Intron 31 -90 G/A	-	-	0.01	neu
g.20453 insTTCA	Exon 31 ins(TTCA)	c.3721insTTCA	p.S1230X	0.01	(36)
g.20459 C>T	Exon 31 C/T	c.3726 C/T	p.Q1233X	0.03	(36)
g.20676 G>A	Intron 32 -91G/A	-	-	0.01	(17)
g.20711 C>T	Intron 32 -66 C/T	-	-	0.17	(34)

**Tab. 3.3 Ergebnisse der Sequenzierung:** In der linken Spalte sind die Art des jeweiligen Nukleotidunterschieds im Vergleich zur Referenzsequenz und seine Position im Genom aufgelistet. In der zweiten Spalte ist die Position im Exon respektive im Intron des Gens genannt. Wenn die Variante sich im Exon befindet, ist die Position des Codons innerhalb der cDNA und die Position der Aminosäure im Protein in den nächsten beiden Spalten angezeigt.

Die Allelfrequenz (MAF) gibt an, wie häufig innerhalb des Patientenkollektivs der Genotyp zu finden war.

Unter Status ist angegeben, ob die Variante bisher in Studien erwähnt wurde. Einzelne Varianten wurden nicht in Studien erwähnt, sondern waren ausschließlich in der Referenzsequenz verzeichnet. Durch die unterschiedliche Bezeichnung der Sequenzen kommt es mitunter vor, dass in den zitierten Studien leicht abweichende Positionen genannt sind. Die Positionsangaben in der vorstehenden Tabelle richten sich nach den Bezeichnungen in den Programmen *CHIP* und *Ensembl Genome Browser* (17, 32).

Mit grau sind die Varianten unterlegt, die in den nachfolgenden Kapiteln genauer besprochen werden.

Die DNA aller hier untersuchten Patienten wurde bereits im Jahr 2003 im Rahmen einer Studie analysiert, die das Mutationsspektrum von Patienten mit HCM untersuchte (34). Im Zuge der Mutationssuche für die Studie wurden sämtliche Sequenzen von Exons und direkte Übergänge zu Introns im MYBC3 mittels SSCP untersucht. Sequenzierungen der DNA wurden nur vorgenommen, wenn Banden bei der SSCP auffällig waren.

Für die vorliegende Arbeit wurden die Exon- und Intronsequenzen aller Patienten sequenziert, unabhängig davon, ob ein Mutationsverdacht vorlag. Dabei wurden Varianten in Exons entdeckt, die offensichtlich bei der vorgenannten Studie durch SSCP nicht auffällig waren.

In den Unterkapiteln 3.3.1 bis 3.3.14 werden die Varianten beschrieben, die entweder bisher noch nicht publiziert oder trotz Publikation in der vorliegenden Arbeit weiteren Experimenten unterzogen wurden.

### **3.3.1 5' -200 del (G)**

Im Vergleich zu der verwendeten Referenzsequenz zeigen alle Patienten am 5'-Ende des Gens die Deletion der Base Guanin auf. Alle Patienten sind für die Variante homozygot. Die Allelfrequenz beträgt daher 1,0.

Der Bereich, in dem die Deletion liegt, gehört zur 5'-flankierenden Sequenz. Das ist der Bereich, der vor dem ersten Exon des Gens liegt. Flankierende Sequenzen können Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren enthalten (142). Es wurde daher weiter untersucht, ob die Variante Kennsequenzen der Transkriptionsfaktoren GC-Box, TATA-Box, CAAT-Box, TPA-response-Element und cAMP-response-Element verändert. Die Variante führt aber nicht zu derartigen Veränderungen.

Es ist davon auszugehen, dass es sich am wahrscheinlichsten um einen Fehler in der Referenzsequenz handelt.

Weitere Untersuchungen zur Deletion wurden nicht durchgeführt.

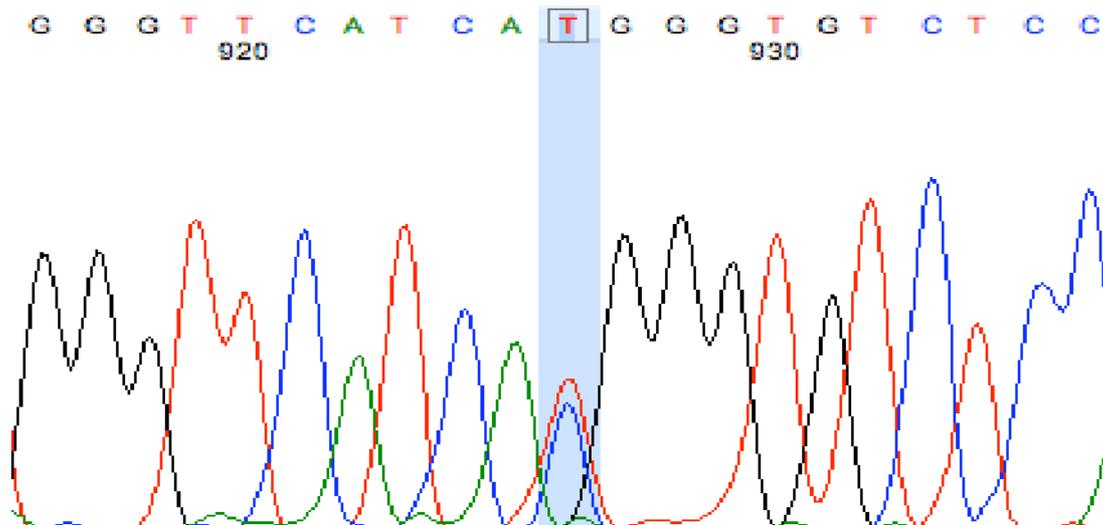
### **3.3.2 Intron 2 –303 C/T**

Im zweiten Intron des Gens konnte bei einem einzigen Patienten eine fehlende Übereinstimmung zu der verwendeten Referenzsequenz nachgewiesen werden. Es handelt sich um eine Basensubstitution, bei der Cytosin gegen Thymin ausgetauscht ist. Der Patient ist heterozygot für die Variante.

Die Größe des gesamten zweiten Introns beträgt 1117 Nukleotide. Die Variante befindet sich 303 Basen vom Beginn des Exons 2 entfernt. Die Position im Intron und die flankierenden Sequenzen zeigen, dass sich die Variante außerhalb der Konsensus-Sequenzen für Spleißstellen befindet. Solche Sequenzen befinden sich unmittelbar am Übergang zwischen Exons und Introns. Sie umfassen meist weniger als 20 Nukleotide auf intronischer Seite.

Der Abstand zum folgenden Exon und die Sequenz, innerhalb derer sich die Variante befindet, lassen ausschließen, dass die *branch site* betroffen ist. Bei der *branch site* handelt es sich um eine Sequenz im Intron, die gewöhnlich 20 Nukleotide vom stromabwärts liegenden Exon entfernt ist und eine zusätzliche Bindungsstelle für den Spleißapparat darstellt.

In Abb. 3.3.2 ist das Elektropherogramm des Patienten mit der Variante dargestellt.



**Abb. 3.3.2 Elektropherogramm des Patienten mit der Variante Intron 2 -303 C/T:** In der Bildmitte ist die Position der Variante markiert. Das Sequenziergerät empfing an dieser Stelle kein einheitliches Signal. Es erkannte sowohl ein Signal für Thymin (rot), als auch für Cytosin (blau). Das bedeutet, dass sich die beiden Allele in der Sequenz unterscheiden. Die Darstellung entspricht folglich einem heterozygoten Befund einer Variante.

Der Vergleich der Sequenz mittels BLAT zeigt, dass die Konservierung des Abschnitts, der die Substitution enthält, vergleichsweise schwach ausgeprägt ist. Die Variante wurde keinen weiteren Untersuchungen unterzogen.

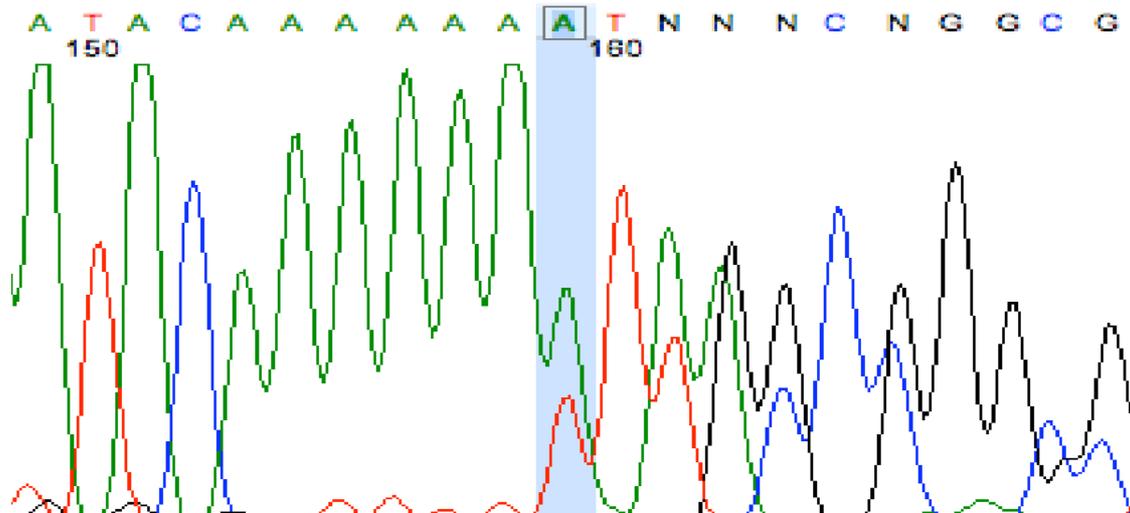
### **3.3.3 Intron 4 -180 del (A)**

Die Variante befindet sich im vierten Intron des Gens. Sie besteht aus der Deletion eines Adeninnukleotids. Die Variante liegt bei einer Gesamtlänge des Introns von 389 Basen fast in der Mitte der Sequenz. Sie betrifft das Ende einer aus sieben Adeninmolekülen bestehenden Region.

Unter Berücksichtigung der Position und der flankierenden Sequenzen wurde eine Veränderung von Kennsequenzen für den Spleißapparat ausgeschlossen.

Die Variante findet sich bei 21 Patienten. Alle Patienten sind heterozygot für die Deletion.

Abb. 3.3.3a zeigt das Elektropherogramm eines Patienten, der Träger der Deletion ist.



**Abb. 3.3.3a Elektropherogramm eines Patienten mit der Variante Intron 4 -180 del (A):** In der Bildmitte ist die Position der Deletion markiert. Die stromabwärts gelegenen Basen konnten vom Sequenziergerät nicht mehr eindeutig erkannt werden, weil sie sich mit dem Strang des anderen Allels überlagern. Die Bestätigung des Befundes erfolgte durch Sequenzierung des Gegenstrangs.

Bei den übrigen 23 Personen aus dem Patientenkollektiv ist das Adeninmolekül in der angegebenen Position in keinem der beiden Stränge erkennbar. Die Deletion ist hier homozygot.

Alle Patienten waren folglich entweder hetero- oder homozygote Träger der Deletion.

Der Vergleich mit Sequenzen anderer Wirbeltiere zeigt, dass nur Primaten in der Position eine identische Sequenz besitzen. Weitere Spezies weisen in der Position abweichende Basen oder eine Lücke auf. Eine Lücke kann Zeichen dafür sein, dass es im Laufe der Evolution zu einer Deletion an dieser Position gekommen ist. Ferner ist denkbar, dass in der Entwicklung menschlicher DNA hier eine Base inseriert wurde.

Es wurden keine weiteren Untersuchungen zu der Variante durchgeführt.

### **3.3.4 Intron 5 -12 del (C)**

Die Variante besteht aus einer Deletion im fünften Intron des Gens. Sie ist 12 Basen vom Beginn des folgenden fünften Exons entfernt. Die Variante befindet sich innerhalb der Region, die nach der Berechnung von Kol et al. als sog. Polypyrimidin-Region des Intron vorausgesagt wird (73). In Polypyrimidin-Regionen können Proteine binden, die Einfluss auf das Spleißen der mRNA haben.

Die Deletion wurde bei 40 Patienten gefunden. Davon sind 18 Patienten heterozygot und 22 Patienten homozygot für die Variante. Bei vier Patienten war eine sichere Aussage über das Vorhandensein der Deletion nicht möglich, weil die Elektropherogramme auch nach wiederholter PCR keine verlässlichen Aussagen über das Vorhandensein oder Fehlen der Variante zuließen.

Bei dem Genomvergleich fiel auf, dass die dem Menschen nahestehenden Primaten in der Position der Variante keine Übereinstimmung mit der Sequenz des Menschen besitzen. Ihnen fehlt an dieser Stelle das Cytosinmolekül, ebenso wie den Trägern der Variante.

Zu dieser Variante wurden keine weiteren Untersuchungen vorgenommen.

### **3.3.5 Intron 11 -111 G/T**

Die Variante besteht aus einer Basensubstitution im Intron 11 des Gens. Anstelle von Guanin, wie in der Referenzsequenz, findet sich bei einem Patienten Thymin an dieser Position. Nur ein Patient ist Träger der heterozygoten Variante.

Lage und flankierende Sequenzen im Intron sprechen gegen eine Veränderung von Spleißdonor- oder Spleißakzeptorstelle. Es ist aber möglich, dass durch die Substitution eine kryptische Spleißdonorstelle entstanden ist. Bei kryptischen Spleißstellen handelt es sich um Sequenzen, die große Ähnlichkeit mit regulären Konsensus-Sequenzen von Spleißstellen aufweisen.

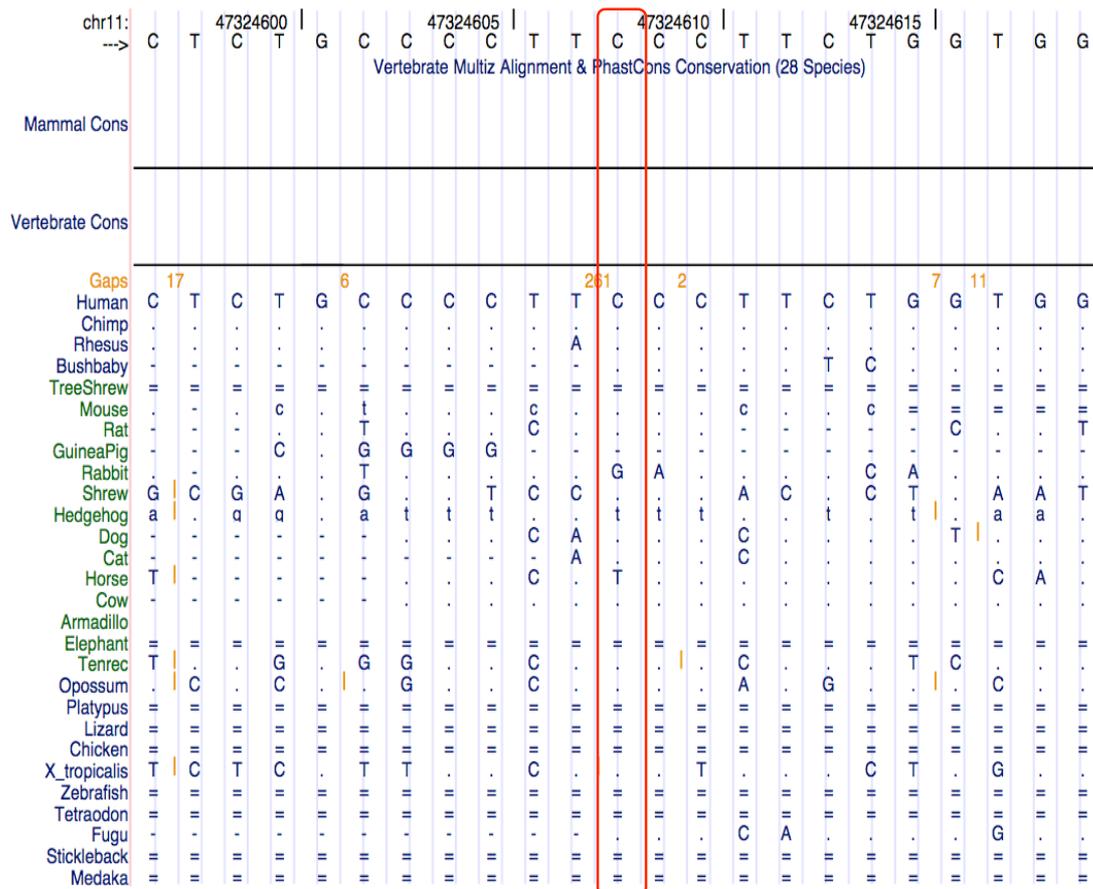
Sie können entgegen der Regel Bindungen mit dem Spleißapparat eingehen und dadurch zu irregulär gespleißter mRNA führen. Nachfolgend sind die Sequenzen der Spleißdonorstelle, der Referenz und der Variante gezeigt.

Konsensus-Sequenz der Spleißdonorstelle: C/A AG **GT** A/G AGT  
Referenzsequenz: AAG GG AAGG  
Sequenz mit Variante: AAG GT AAGG

Durch /-Striche ist angezeigt, dass in der DNA entweder die eine oder andere Base in der Donorstelle vorkommen kann. In den unteren beiden Zeilen sind die Sequenzen der Referenz und die des Patienten mit der Variante Intron 11 -111 G/T gezeigt. Es wird deutlich, dass sich die Sequenz mit der Variante nur in einer Position von der Konsensus-Sequenz der Spleißdonorstelle unterscheidet.

Die Übereinstimmung mit der Konsensus-Sequenz für die Spleißdonorstelle wurde nach dem Verfahren von Shapiro und Senapathy berechnet (134). Es ergab sich ein Score von 94,59 für die Übereinstimmung mit einer Spleißdonorstelle bei einem maximal erreichbaren Ergebnis von 100. Zum Vergleich wurden die Scores der von der Variante stromaufwärts und stromabwärts liegenden Spleißdonorstellen berechnet. Es ergaben sich Werte von 83,99 für die stromaufwärts liegende und 92,0 für die stromabwärts liegende Spleißdonorstelle.

Das Ergebnis des Sequenzvergleichs ist bei Abb. 3.3.5 erläutert.



**Abb. 3.3.5 Homologievergleich im Bereich der Variante Intron 11 -111 G/T:**

Im oberen Teil der Abbildung ist der komplementäre Strang der eingegebenen Sequenz erkennbar. Sie entspricht der Sequenz des Menschen. Rot umrandet ist die Position, in der die Substitution der Patienten-DNA gefunden wurde.

Punkte zeigen an, dass menschliche DNA und Tier-DNA in dieser Position identisch sind. Striche in den Sequenzen der Spezies zeigen an, dass bei dem jeweiligen Tier keine Base an dieser Position vorhanden ist. Doppelstriche zeigen an, dass mindestens eine Base nicht mit der eingegebenen Sequenz übereinstimmt.

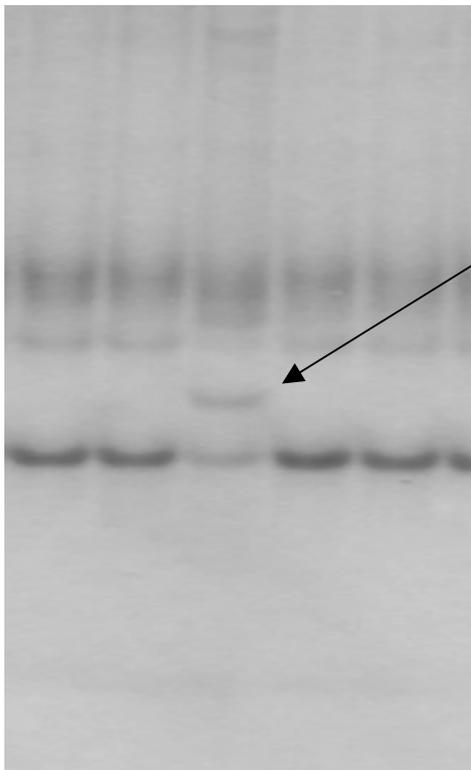
Es wird deutlich, dass 13 der 27 Vergleichsequenzen übereinstimmende Nukleotide mit dem Menschen in der Position der Variante besitzen. Da sich die benachbarten Sequenzen jedoch stärker voneinander unterscheiden, wird die Region um die Variante als wenig konserviert bewertet. Entsprechend wird kein Graph für eine Konservierung für diesen Genabschnitt angezeigt.



Um herauszufinden, ob Patienten ohne HCM ebenfalls Träger der Variante sind, wurde eine Kontrolluntersuchung mit DNA nicht erkrankter Probanden durchgeführt. Es gelang zunächst, ein Fragment von 168 bp Größe, das die Variante enthielt, mit der PCR zu amplifizieren. Anschließend zeigte sich, dass die DNA mit der Variante bei RT bei der SSCP anderes Bandenmuster aufwies, als DNA, die nachweislich nicht die Variante hatte.

Beim Vergleich mit der DNA von 216 Probanden ohne HCM fand sich kein Fragment mit gleichem Bandenmuster wie das der Patienten-DNA. Zwei Probanden hatten eine DNA mit ähnlichen Banden wie die der Patienten. Die Sequenzierung ihrer DNA zeigte jedoch nicht die Variante. Per Definitionem handelt es sich bei der Variante nicht um einen Polymorphismus, sondern um eine Mutation.

Abb. 3.3.6b zeigt einen Ausschnitt eines der PAA-Gele der SSCP bei RT.



**Abb. 3.3.6b PAA-Gel mit DNA eines Patienten mit der Variante Intron 11 -2 A/G:** In der Bildmitte ist die mit Silber gefärbte DNA des Patienten mit der Variante erkennbar. Sie zeigt eine zusätzliche Bande (Pfeil). Im Gegensatz dazu ist in der DNA an identischer Position im Genom bei den Vergleichsprobanden ohne HCM keine zusätzliche Bande erkennbar.

Dieselben Patienten, die Träger der Variante an der Spleißakzeptorstelle sind, wurden bereits in der erwähnten Arbeit von Erdmann et al. auf Varianten am Übergang zwischen Exons und Introns mit SSCP untersucht (34). Hierbei wurden andere Fragmente verwendet. Die Variante konnte dabei nicht durch ein auffälliges Bandenmuster identifiziert werden.

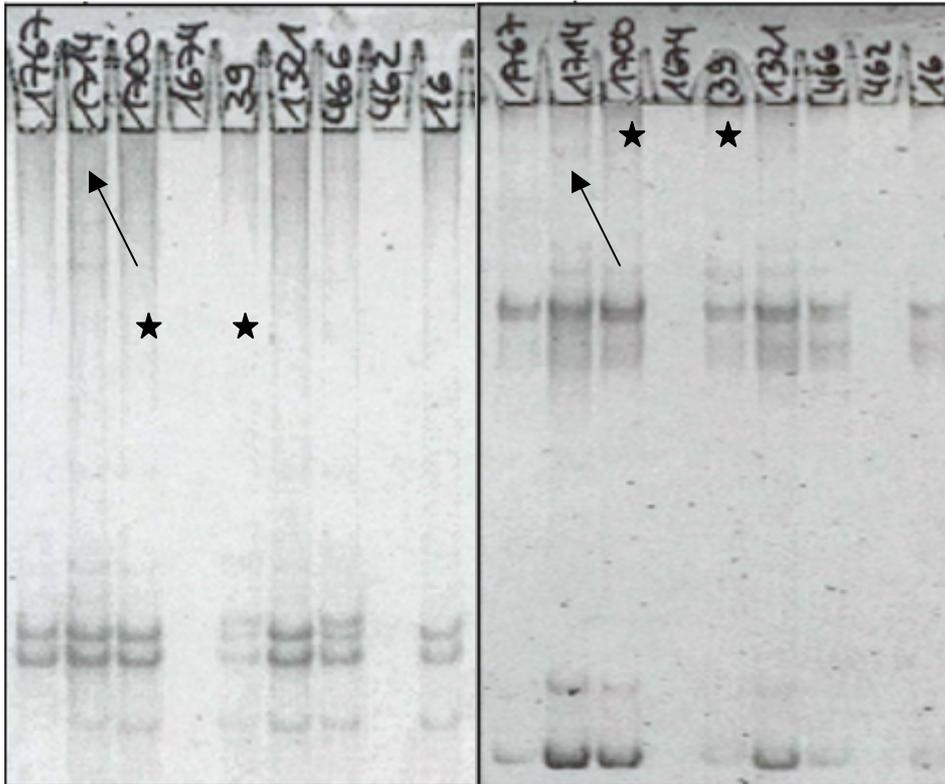
### **3.3.7 Exon 11 C/A, p.S311X**

Die Variante besteht aus einer Basensubstitution von Cytosin zugunsten von Adenin. Der Austausch betrifft das elfte Exon des Gens. Nur eine Patientin war Trägerin der Variante. Sie ist heterozygote Trägerin der Substitution.

Der Austausch betrifft ein Codon, das für die Aminosäure Serin kodiert. Durch die Substitution entsteht ein neues Codon mit der Kombination CTA. Dieses Triplet kodiert für ein Stopcodon in der mRNA. Während der Translation an den Ribosomen wird hier die Synthese des Proteins vorzeitig beendet. Es entsteht so ein trunkiertes Protein.

Die Patientin war bereits vor dieser Arbeit auf Varianten in Exons des MYBPC3 untersucht worden (34). Die hier beschriebene Variante war bei ihr zum damaligen Zeitpunkt nicht identifiziert worden. Als Verfahren zur Detektion von Sequenzvarianten war zum Screening die SSCP verwendet worden.

Abb. 3.3.7 zeigt Gele aus der zitierten Arbeit mit DNA der Patientin.



**Abb. 3.3.7 SSCP der Variante p.S311X aus der Arbeit von Erdmann et al.:** Mit Pfeilen ist die Spur markiert, in der DNA der genannten Patientin gewandert ist. Links ist das Ergebnis der SSCP bei RT zu sehen, rechts das Ergebnis bei +4° C. Unter beiden Versuchsbedingungen ist kein abweichendes Bandenmuster im Vergleich zur übrigen DNA erkennbar, wenn unterschiedliche Stärkegrade der Färbung unberücksichtigt bleiben. Die DNA der Patienten aus den Spuren 1700 und 39 (Sternchen) wurde für diese Arbeit ebenfalls sequenziert. Sie waren nicht Träger der Substitution. Ihre Banden zeigen in der SSCP keinen Unterschied zu der Patientin.

Bei der Patientin war im Alter von 45 Jahren die Diagnose einer HCM gestellt worden. Echokardiographisch zeigt sich ein hypertrophiertes IVS mit 19 mm Durchmesser. Der Durchmesser der Hinterwand beträgt 12 mm.

Die LVEF als Ausdruck der systolischen Herzfunktion beträgt 63%. Der LVEDD misst bei der Patientin 38 mm. Als Symptom äußert die Patientin ausschließlich Dyspnoe.

Die Patientin ist Trägerin weiterer Varianten in Introns und Exons des MYBPC3. Die Familienanamnese der Patientin ist positiv.

### **3.3.8 Exon 14 ins C, p.P452X**

Die Variante besteht aus einem zusätzlichen Cytosinmolekül in Exon 14. Die Variante fand sich nur einmal bei allen untersuchten Patienten bei einer weiteren Patientin. Sie ist heterozygote Trägerin der Insertion. Die Insertion führt zu einem Verschieben des Leserasters (engl. *frame shift*) bei der Translation der Triplets in Aminosäuren. Nachfolgend ist gezeigt, wie der Mechanismus der Leserasterverschiebung wirkt:

Triplets der cDNA des Wildtyp: GAG CCC CCT GTG ... GTG GAG TTT GAG  
Codons der Aminosäuren:        E   P   P   V        V   E   F   E

Triplets der cDNA bei Insertion: GAG CCC **C**CC TGT ... GGT GGA GTT TGA  
Codons der Aminosäuren:        E   P   P   C        G   G   V   X

Durch die Insertion schiebt sich die gesamte stromabwärts liegende DNA um eine Position weiter. Es kommt zur Bildung anderer Triplets. 21 Triplets nach der Insertion bildet sich ein vorzeitiges Stopcodon (durch X symbolisiert). Bei der Translation wird an der Stelle des Stopcodons die Synthese des Proteins vorzeitig beendet. Das entstandene Protein ist unvollständig.

Die Trägerin dieser Variante war ebenfalls vor der Sequenzierung für die vorliegende Arbeit im Rahmen der genannten Studie von Erdmann et al. auf Varianten in Exons des Gens untersucht worden (34). Das Screening mittels SSCP hatte für Einzelstränge des Exon 14 kein Muster mit aberranten DNA-Banden gezeigt.

Die Patientin ist 46 Jahre alt. Das Alter bei Erstmanifestation ist nicht bekannt. Das IVS ist mit einem Durchmesser von 18 mm hypertrophiert. Auch die HW ist mit 14 mm vergrößert. Bei einem LVEDD von 39 mm ist keine Dilatation nachweisbar. Die LVEF beträgt 57% bei gleichzeitigem Vorliegen eines SAM. Ob die Patientin unter Beschwerden aufgrund der HOCM leidet, ist nicht

bekannt. Bei der Patientin wurde bereits eine TASH durchgeführt. Die Familienanamnese ist positiv.

Die Patientin ist Trägerin weiterer Varianten in Exons und Introns des Gens.

### **3.3.9 Intron 20 -123 ins (GAGACTT)**

Bei dieser Variante handelt es sich um eine Insertion von sieben Basen (GAGACTT) im 20. Intron des Gens. Nur einer von allen untersuchten Patienten war Träger der Variante. Er ist heterozygot für die Insertion. Die Variante liegt außerhalb der Kennsequenzen für Spleißstellen. Auch die *branch site* ist nicht betroffen. Es entstehen keine neuen kryptischen Spleißstellen, die einen höheren Score als die natürlichen Stellen besitzen.

Der Genomvergleich zeigt, dass die Variante in einem Bereich liegt, der nur geringe Homologie mit den Sequenzen anderer Spezies aufweist.

Der Patient ist männlich. Zum Zeitpunkt der DNA-Isolation war er 23 Jahre alt. Weitere Angaben zu dem Patienten fehlen.

Obwohl die Variante bislang noch nicht beschrieben ist und einmalig im Patientenkollektiv ist, wurden keine weiteren Untersuchungen zu dieser Variante angestellt. Denn die geringe Konservierung der Sequenz lässt eine funktionelle Bedeutung unwahrscheinlich erscheinen.

### **3.3.10 Intron 22 -123 del (TC)**

Die Variante besteht aus der Deletion eines Dinukleotids von Thymin und Cytosin in Intron 22 des Gens. Sie befindet sich 123 Basen vom folgenden Exon entfernt und liegt damit außerhalb von Spleißstellensequenzen. Die Variante wurde bei acht Patienten gefunden. Alle Patienten sind heterozygote Träger.

Der Genomvergleich zeigt, dass die Konservierung in dem Areal, das die Deletion enthält, gering ist. Es wurden keine weiteren Untersuchungen angestellt.

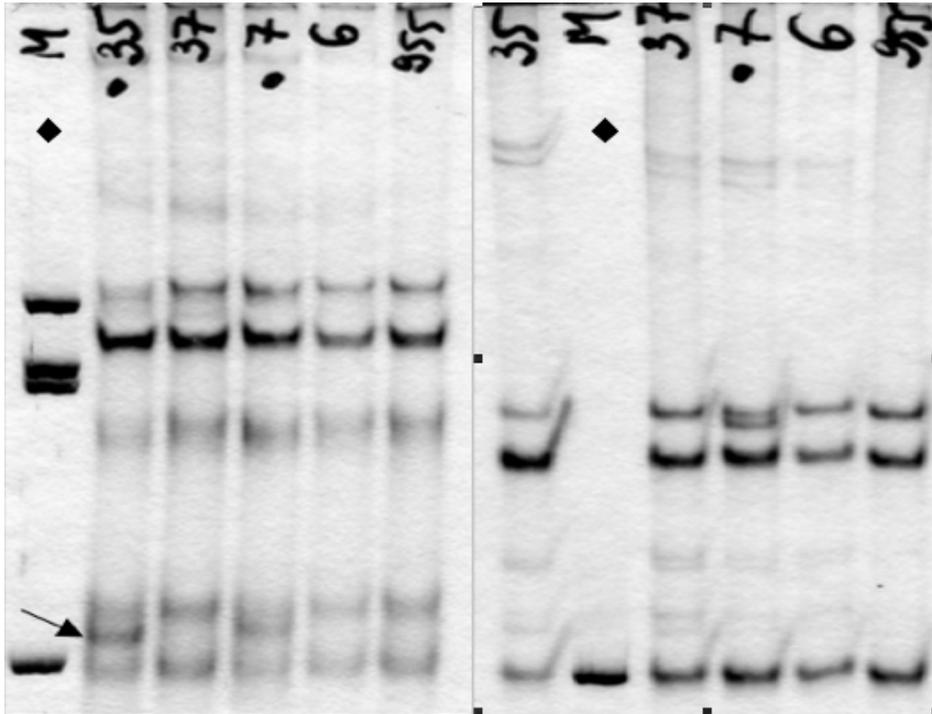
### **3.3.11 Exon 25 C/G, p.T956S**

Diese Variante besteht aus einer Substitution eines Nukleotids in Exon 25. Cytosin ist gegen Guanin ausgetauscht. Die Variante findet sich bei nur einem der untersuchten Patienten. Er ist heterozygoter Träger der Substitution.

Der Basenaustausch findet an einer nichtdegenerierten Position des Triplets statt. Das bedeutet, die Substitution ist nicht synonym. Anstelle des Codons ACC, das für die Aminosäure Threonin kodiert, entsteht das Codon AGC. Das Triplett mit Guanin in zweiter Position kodiert für die Aminosäure Serin. Die Änderung im Triplett führt folglich zu einer veränderten Aminosäurezusammensetzung im Protein. Wegen der unterschiedlichen chemischen und physikalischen Eigenschaften der proteinogenen Aminosäuren können sich die Struktur und Funktion der Proteine ändern.

Der Patient mit der Variante in Exon 25 wurde bereits auf Veränderungen in Exons mittels SSCP von Erdmann et al. untersucht (34). Hinweise für eine Substitution wurden nicht gefunden.

Abb. 3.3.11 gibt das Ergebnis der SSCP aus der genannten Studie wieder.



**Abb. 3.3.11 SSCP des Patienten mit der Variante p.T956S:** Das linke Bild zeigt das Gel unter Versuchsbedingungen bei  $+4^{\circ}\text{C}$ , rechts bei RT. Nachträglich betrachtet zeigt die DNA mit der Variante (Spur 35) ein anderes Laufverhalten als die übrigen Proben auf dem Gel (s. Pfeil im linken Bild). Bei RT sind keine Unterschiede erkennbar. Die Spur mit der Beschriftung 7 bei RT enthält DNA mit einer anderen Variante. Der bp-Standard ist mit der Raute gekennzeichnet.

Der Patient war zum Zeitpunkt der DNA-Isolation 57 Jahre alt. Wann die Erstdiagnose der Erkrankung erfolgte, ist nicht bekannt. Die Daten der Echokardiographie zeigten einen asymmetrisch hypertrophierten linken Ventrikel mit einem Durchmesser des IVS von 20 mm. Die Hinterwand war mit 10 mm nicht vergrößert. Hinweise auf eine Ventrikeldilatation lagen bei einem LVEDD von 41 mm nicht vor. Die Familienanamnese des Patienten ist positiv.

**3.3.12 Exon 28 del (G), p.G1078X**

Die Variante befindet sich in Exon 28 des Gens. Sie besteht aus einer Deletion von Guanin. Ein Patient fand sich als Träger des Merkmals. Die Deletion war bei ihm heterozygot.

Wie bei einer Insertion in einem Exon kommt es auch durch eine Deletion zu einem Verschieben des Leserasters (s. a. Kapitel 3.3.8, Variante p.P452X). Die von der Deletion stromabwärts liegenden Codons werden anders arrangiert, so dass sich eine neue Aminosäurezusammensetzung im Protein ergibt:

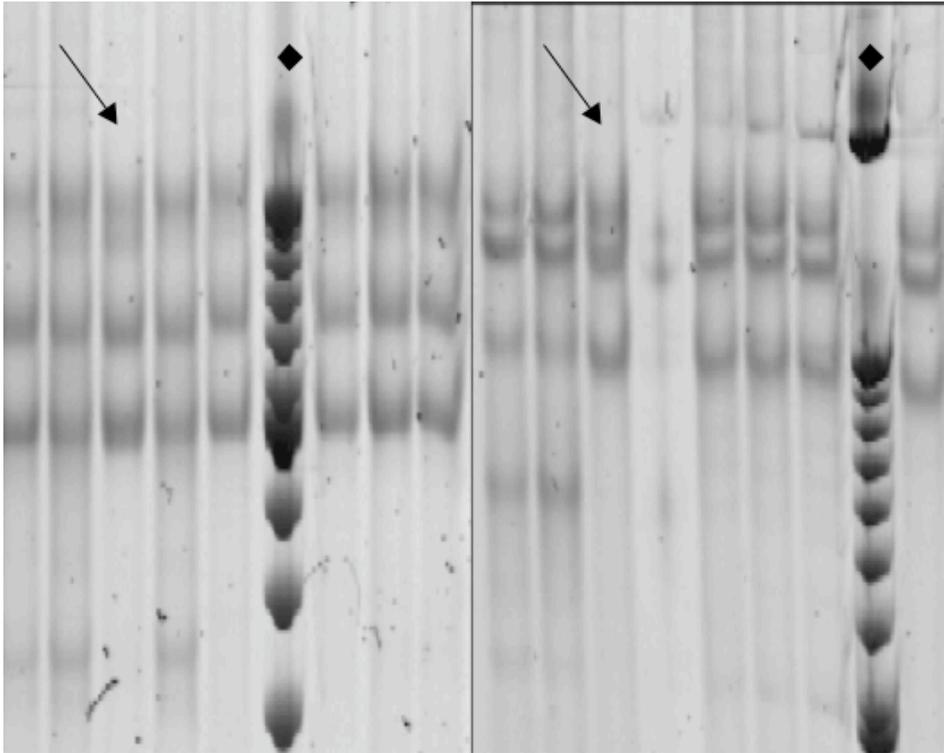
Tripletts der cDNA des Wildtyp: TGG G(**G**)T CTT AAT GTG GCT CTG GAG  
 Codons der Aminosäuren:        W    G    L    N    V    A    L    E

Tripletts der cDNA bei Deletion: TGG GTC TTA ATG TGG CTC TGG AGT  
 Codons der Aminosäuren:        W    V    L    M    W    L    W    S

Die Verschiebung des Leserasters bewirkt im Falle dieser Deletion nicht nur, dass andere Tripletts für Aminosäuren entstehen. 109 Tripletts nach der Deletion kommt es zur Bildung eines Codons, das für einen Stopp in der Translation kodiert. Die Proteinsynthese an den Ribosomen wird hier beendet. Das synthetisierte Protein ist unvollständig.

Auch dieser Patient war bereits auf Varianten in Exons des MYBPC3 untersucht worden, ohne dass sich Hinweise auf die beschriebene Mutation ergaben (34).

Abb. 3.3.12 zeigt die Ergebnisse der SSCP von den genannten Voruntersuchungen.



**Abb. 3.3.12 SSCP der DNA mit der Variante p.G1078X:** In der jeweils dritten Spur (Pfeil) der beiden Bilder befindet sich die Probe des Trägers mit der Mutation. Das linke Bild entstand bei einer SSCP bei +4° C, rechts bei RT. Ein eindeutiges abweichendes Bandenmuster ist im Vergleich zu den übrigen Banden nicht erkennbar. Nachträglich betrachtet erscheinen allerdings besonders unter Bedingungen von RT die Banden verbreitert. Die vierte zusätzliche Bande in der jeweils ersten, zweiten und vierten Spur wurde durch eine andere Variante verursacht. Mit der Raute ist der bp-Standard markiert.

Bei der Blutentnahme zur DNA-Isolation war der Patient 53 Jahre alt. Die Diagnose der HCM wurde im Lebensalter von 35 Jahren gestellt. Bei dem Patienten wurde bereits eine TASH durchgeführt.

IVS und HW sind mit 23 respektive 13 mm Durchmesser hypertrophiert. Echokardiographisch ist ein SAM erkennbar. Die LVEF ist mit 73% nicht vermindert. Bei einem LVEDD von 48 mm ist der linke Ventrikel nicht dilatiert. Der Patient ist mit pectanginösen Beschwerden und Dyspnoe symptomatisch. Die Familienanamnese ist negativ.

### **3.3.13 Intron 31 -90 G/A**

Die Variante betrifft Intron 31. Hier ist in Folge einer Basensubstitution Guanin gegen Adenin ausgetauscht. Die Position im Intron zeigt an, dass weder Spleißstellen noch *branch site* betroffen sind. Nur ein Patient ist Träger dieser Variante. Er ist heterozygoter Träger der Substitution.

Der Homologievergleich zeigt, dass zwar die Hälfte der verglichenen Genome an dieser Position mit der Referenzsequenz übereinstimmen. 15 der 27 Vergleichssequenzen weisen jedoch eine Lücke in diesem Bereich auf. Die Lücken deuten daraufhin, dass bei den Vergleichsspezies keine sichere Aussage über die Nukleotidfolge in diesem Bereich gemacht werden kann. Somit kann auch die Konservierung in dieser Region nicht sicher bestimmt werden.

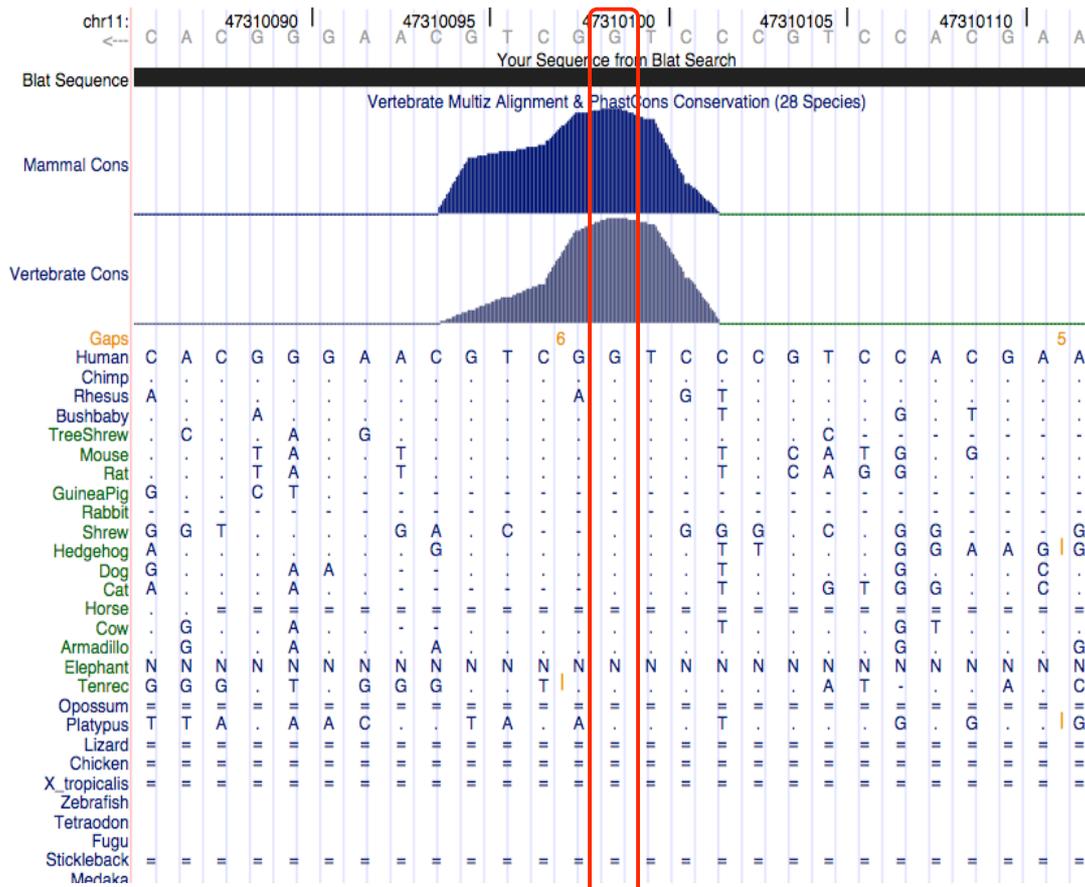
Es wurden keine weiteren Untersuchungen durchgeführt.

### **3.3.14 Intron 32 -91 G/A**

Die Variante befindet sich in Intron 32 des Gens. Sie besteht aus einer Basensubstitution, bei der Guanin gegen Adenin ausgetauscht wird. Die Variante konnte bei einem Patienten nachgewiesen werden. Er ist heterozygoter Träger der Substitution.

Der Vergleich mit den Sequenzen anderer Spezies zeigt, dass sich die Substitution in einer Region befindet, die, verglichen mit den benachbarten Sequenzen des Introns, stärker konserviert ist.

In Abb. 3.3.14 ist die Graphik des Genomvergleichs gezeigt.



**Abb. 3.3.14 Homologievergleich im Bereich der Variante Intron 32 -91 G/A:** Gezeigt ist ein Ausschnitt aus der Sequenz des Introns 32. Umrandet ist die Position, an der sich die Substitution befindet. Die Graphen der Konservierung zeigen an, dass sich die Variante in einem Bereich stärkerer Konservierung befindet. Insgesamt haben 14 der verglichenen 27 Tiersequenzen an der Position der Variante eine identische Base.

Die Variante wurde bereits von anderen Untersuchern publiziert. Es fanden sich jedoch keine Daten zu weiterführenden Untersuchungen.

Zur Feststellung, ob es sich die um einen häufig auftretenden Polymorphismus oder um eine Mutation handelt, wurde eine SSCP durchgeführt. Ein 206 bp großes Segment, das die Variante enthält, konnte zunächst amplifiziert werden. Bei Raumtemperatur konnte gezeigt werden, dass in der SSCP das Fragment mit der Variante ein abweichendes Laufmuster im Vergleich zur DNA ohne die Variante aufwies. Es wurde eine SSCP mit DNA von 212 Patienten ohne HCM durchgeführt. Keine der 212 Proben zeigte das gleiche Wanderungsverhalten wie das des Patienten. Per Definitionem kann die Variante als Mutation bezeichnet werden.

### **3.3.15 Bereits bekannte Varianten**

Neben den bisher genannten Varianten, die durch SSCP in den Arbeiten von Erdmann et al. nicht entdeckt wurden, konnten zwei weitere exonische Varianten gefunden werden (34). Zum einen handelt es sich um die bereits bekannte Insertion eines Adenin-Dinukleotids p.T1041X bei einem Patienten. Die Variante liegt in Exon 27 und führt zu einem vorzeitigen Stopcodon. Zum anderen konnte ein weiterer Patient mit der Variante p.Q1233X identifiziert werden. Sie betrifft Exon 31 und bewirkt ebenfalls die Synthese eines vorzeitigen Stopcodons.

### **3.4 Statistische Berechnung**

In Tab. 3.4 sind die gefundenen Allelfrequenzen der in Kapitel 3.3.2 bis 3.3.14 beschriebenen Varianten nochmals aufgelistet. Dieses Mal wurden Prozentangaben verwendet. In der Tabelle ist zudem die Häufigkeit der jeweiligen Allele innerhalb des Patientenkollektivs angegeben. Daneben ist die Allelhäufigkeit unter Berücksichtigung des Hardy-Weinberg-Gesetzes für eine ideale Population angegeben. Der p-Wert gibt an, ob sich die beobachteten Werte aus dem Kollektiv signifikant von der errechneten Häufigkeit nach Hardy und Weinberg unterscheiden.

<b>Variante</b>	<b>Allelfrequenz der Variante [%]</b>	<b>Häufigkeit bei Patienten mit HCM</b>	<b>Häufigkeit nach Hardy-Weinberg</b>	<b>p-Wert</b>
Intron 2 -303 C/T	1	C/C: 43 C/T: 1 T/T: 0	C/C: 43,01 C/T: 0,99 T/T: 0,01	0,939
Intron 4 -180 del(A)	76	-/-: 21 -/A: 20 A/A: 0	-/-: 23,44 -/A: 15,12 A/A: 2,44	0,039

Variante	Allelfrequenz der Variante [%]	Häufigkeit bei Patienten mit HCM	Häufigkeit nach Hardy- Weinberg	p- Wert
Intron 5 -12 del(C)	79	-/-: 21 -/T: 18 T/T: 0	-/-: 20,83 -/T: 15,35 T/T: 2,83	0,061
Intron 11 -111 G/T	1	G/G: 43 G/T: 1 T/T: 0	G/G: 43,01 G/T: 0,99 T/T: 0,01	0,939
Intron 11 -2 A/G	2	A/A: 42 A/G: 2 G/G: 0	A/A: 42,02 A/G: 1,95 G/G: 0,02	0,877
Exon 11 C/A p.S311X	1	C/C: 43 C/A: 1 A/A: 0	G/G: 43,01 -/G: 0,99 -/-: 0,01	0,939
Exon 14 ins(C) p.P452X	1	-/-: 43 -/C: 1 C/C: 0	-/-: 43,01 -/C: 0,99 C/C: 0,01	0,939
Intron 20 -123 ins(GAGACTT)	1	-/-: 43 -/+ : 1 +/+ : 0	-/-: 43,01 -/+ : 0,99 +/+ : 0,01	0,939
Intron 22 -123 del(TC)	9	TC/TC: 36 --/TC: 8 --/--: 0	TC/TC: 36,36 --/TC: 7,27 --/--: 0,36	0,507
Exon 25 C/G p.T956S	1	C/C: 43 C/G: 1 G/G: 0	G/G: 43,01 -/G: 0,99 -/-: 0,01	0,939
Exon 28 del(G) p.G1087V	1	G/G: 43 -/G: 1 -/-: 0	G/G: 43,01 -/G: 0,99 -/-: 0,01	0,939
Intron 31 -90 G/A	1	G/G: 41 A/G: 1 A/A: 0	G/G: 41,01 A/G: 0,99 A/A: 0,01	0,938

Variante	Allelfrequenz der Variante [%]	Häufigkeit bei Patienten mit HCM	Häufigkeit nach Hardy- Weinberg	p- Wert
Intron 32 -91 G/A	1	G/G: 42 A/G: 1 A/A: 0	G/G: 42,00 A/G: 0,99 A/A: 0,01	0,939

**Tab. 3.4. Ergebnisse der statistischen Berechnung:** Die p-Werte zeigen, dass sich die gefundenen Werte und die nach Hardy und Weinberg ermittelten Werte nicht signifikant unterscheiden, da alle p-Werte  $>0,05$  sind. Einzige Ausnahme stellt die Deletion in Intron 4 dar.

## **4. Diskussion**

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde ein Großteil der genomischen Sequenz des MYBPC3-Gens von 44 Patienten mit einer HCM sequenziert. Es wurde untersucht, ob Varianten in Intronsequenzen nachgewiesen werden können, die den Phänotyp einer HCM beeinflussen können.

Nach Kenntnis des Verfassers ist die vorliegende Arbeit der weltweit erste Versuch, mit einer derartig umfassenden Sequenzierung, Mutationen im MYBPC3 aufzufinden.

Alle Patienten erfüllten echokardiographisch die Kriterien zur Diagnosestellung einer HCM oder befanden sich im Zustand nach einer Intervention zur Reduktion der Myokardmasse bei vorbestehender linksventrikulärer Hypertrophie.

Insgesamt wurden 22 Varianten in Exons des Gens gefunden. Darunter sind vier bislang nicht publizierte Varianten, die sich jeweils nur bei einem Patienten fanden. Drei der exonischen Varianten sind sehr wahrscheinlich pathogen für eine HCM (p.S311X, p.P452X und p.G1078X). In Introns des MYBPC3-Gens konnten 27 Varianten gefunden werden. Von den intronischen Varianten sind neun bislang nicht publiziert. Zwei der intronischen Varianten sind sehr wahrscheinlich pathogen für eine HCM (Intron 11 -2 A/G, Intron 11 -111 G/T).

### **4.1 Auswahl der Patienten**

Alle Patienten, deren DNA auf Varianten im Gen des MYBPC3 untersucht wurden, erfüllten die internationalen Diagnosekriterien einer HCM (90). Die Diagnose wurde aufgrund echokardiographischer Befunde gestellt. Die Patienten zeigten eine Hypertrophie des linken Ventrikels, die meist asymmetrisch war. Die Ventrikel waren nicht dilatiert und zeigten sich in ihrer Aktion hyperdynamisch.

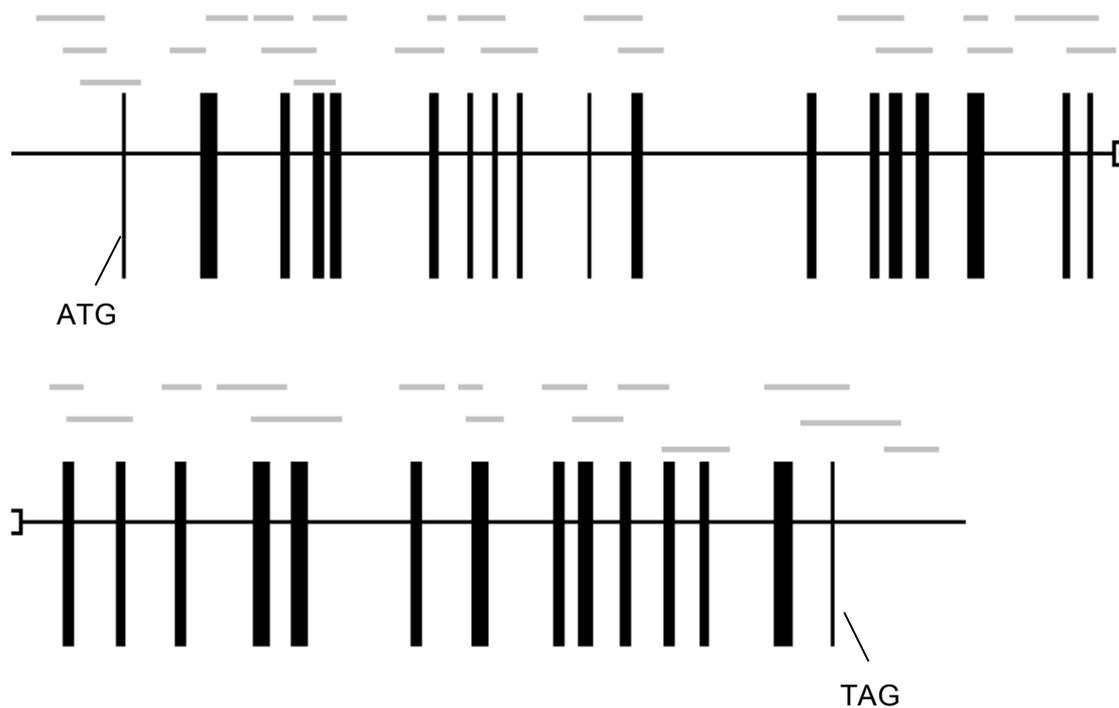
Differentialdiagnostisch wurden systemische Erkrankungen weitestgehend ausgeschlossen, die ebenfalls das Bild einer Myokardhypertrophie verursachen können (93).

Dabei ist darauf hinzuweisen, dass primäre Kardiomyopathien bekannt sind, die mitunter nicht leicht von einer HCM zu unterscheiden sind. Hierzu zählen Glykogenosen, die mit Mutationen der Gene LAMP und PRKAG2 assoziiert sind (4).

#### **4.2 Material und Methoden**

Die Suche nach Varianten im Gen des MYBPC3 erfolgte durch direkte Sequenzierung der Patienten-DNA. Die hierfür notwendige Amplifizierung mit der PCR wurde mit dem Resequencing Set RSS000020042 der Firma Applied Biosystems durchgeführt. Die Firma war auf Anfrage nicht bereit, die vollständigen Sequenzen der im Set enthaltenen Primerpaare bekannt zu geben. Nach Abgleichen der Sequenzierungsergebnisse mit der Referenzsequenz ist davon auszugehen, dass ca. 60% des gesamten Gens mit den Primern abgedeckt werden. Die Sequenz von Exon 12 (Länge 133 bp) und zentrale Anteile sehr großer Introns werden jedoch nicht sicher durch die Primerpaare abgedeckt. 20 Fragmente des Gens waren auch nach wiederholter Sequenzierung nicht auswertbar. Ein Primer zeigte einen kompletten Funktionsausfall. Daher konnte nicht in allen Genabschnitten eine Suche nach Varianten stattfinden.

Abb. 4.2 zeigt, wie die Fragmente der PCR-Produkte im Verhältnis zur Gensequenz angeordnet sind.



**Abb. 4.2 Schematischer Aufbau des MYBPC3-Gens und der PCR-Fragmente:**

Als senkrechte schwarze Banden sind die Exons des Gens symbolisiert. Mit dem Tripletts ATG beginnt der kodierende Teil des Gens, mit dem Tripletts TAG endet er. Die unterschiedliche Stärke der Banden zeigt an, dass die Exons im Gen unterschiedlich groß sind. Zwischen den Exons liegen die Introns.

Oberhalb des Gens sind die Fragmente der PCR als graue waagerechte Banden gezeigt. Es ist erkennbar, dass Teile des Gens überlappend von Fragmenten abgedeckt sind, während andere Teile des Gens zwischen zwei Fragmenten liegen. Die Bereiche, die sich zwischen zwei Fragmenten befinden, werden in der Regel nicht bei der Sequenzierung erfasst.

Zur besseren Übersicht ist ein vereinfachtes Schema dargestellt. Es gibt nicht die exakten Größenverhältnisse wieder.

Die direkte Sequenzierung ist der Goldstandard zum Auffinden von Varianten in DNA. Ihre Anwendung ist aber arbeitsintensiv und zeitaufwendig (99).

Zum Screening von Sarkomer Mutationen bei Patienten mit unerklärter linksventrikulärer Hypertrophie wurde daher häufig in Studien die SSCP angewendet. Bei Anwendung der SSCP werden lediglich die DNA-Fragmente sequenziert, deren Banden aufgrund anderer Nukleotidzusammensetzung abweichendes Verhalten bei der Elektrophorese zeigen.

In der Literatur wird verschiedentlich darauf hingewiesen, dass die Sensitivität der SSCP wesentlich von den Versuchsbedingungen abhängt,

unter denen sie stattfindet. Ein Parameter, der die Sensitivität beeinflusst, ist die Fragmentlänge der Einzelstrang-DNA. Eine SSCP, die Fragmente von einer Länge zwischen 100 bp bis 300 bp nutzt, kann eine Sensitivität von 99% erreichen (57). Als ideal werden Längen von etwa 150 bp angegeben (135). Einfluss auf die Sensitivität hat auch die Gelzusammensetzung. So kann die zusätzliche Gabe von Glycerol die Auflösung der Fragmente verbessern (57, 98).

Die Temperatur, unter der die Versuche stattfinden, kann die Konformationsbildung der Einzelstränge beeinflussen (57, 103). Auch beeinflussen die Position der Variante im Einzelstrang und der Anteil von Cytosin und Guanin im Fragment die Aussichten, Varianten durch abweichendes Bandenmuster im Gel zu finden (62). Die Betrachtung von Abb. 3.3.11 und Abb. 3.3.12 zeigt, dass auch die korrekte Interpretation der gefärbten Bandenmuster entscheidend zum Auffinden von veränderter DNA ist. Weniger bedeutsam ist die Art der Variante (31, 135).

Die Verfasser der zitierten Studien zur SSCP betonen, dass die Sensitivität der SSCP generell hoch sei (57, 98). Eine solche Sensitivität sei aber nur zu erreichen, wenn die SSCP unter verschiedenen Versuchsbedingungen wiederholt werde. Die Abhängigkeit der Sensitivität vom Versuchsaufbau birgt das Risiko, dass Varianten in DNA-Fragmenten bei der SSCP übersehen werden, wenn nur eine begrenzte Anzahl von Versuchsreihen durchgeführt wird. Es ist vorstellbar, dass in der Praxis beim Screening von Patienten nur eine beschränkte Anzahl von Variationen der Versuchsbedingungen getestet wird. Denn der zeitliche und materielle Aufwand sind erheblich.

Die Abhängigkeit vom Versuchsaufbau dürfte ein Grund dafür sein, dass sieben weitere Varianten in Exons und zwei weitere am Intron-Exon-Übergang bei den Arbeiten von Erdmann et al. nicht durch abweichendes Bandenmuster bei der Elektrophorese auffielen, sondern erst durch die direkte Sequenzierung im Rahmen dieser Arbeit entdeckt wurden (34).

Die Beobachtung, dass die SSCP in der zuletzt genannten Arbeit offenbar weniger sensitiv war, als einige Studien vermitteln, sollte bei der Interpretation von Ergebnissen aus Klinik und Studien berücksichtigt werden, wenn eine

SSCP angewendet wurde. Die in Studien publizierten Anzahlen von Sequenzvarianten sind möglicherweise höher, wenn eine SSCP zum Screening verwendet wurde. Bisher abgeleitete Hypothesen zur Beziehung von Genotyp und Phänotyp sind unter Umständen dann unzutreffend, wenn Mutationen im Gen bei Patienten nicht erkannt wurden, und andere Varianten für krankheitsauslösend gehalten wurden.

Eine zu geringe Sensitivität der SSCP kann auch eine Erklärung dafür sein, dass bei linksventrikulärer Hypertrophie nur in ca. 50-60% der Fälle Mutationen in Sarkomerproteinen gefunden werden (139); denn eine direkte Sequenzierung wurde, so weit bekannt, als initiale Untersuchung zum Auffinden von Varianten in einer Gesamtsequenz von Sarkomergenen in keiner Arbeit vorgenommen. Es wurden entweder die SSCP oder andere Screeningverfahren verwendet.

Weitere Möglichkeiten dafür, dass Ursachen einer HCM unentdeckt bleiben, können Mutationen in nicht untersuchten Genen sein. Auch der Einfluss bisher unbekannter Gene oder Fehler bei der Bestimmung des Phänotyps kommen in Frage (125).

Die für diese Arbeit durchgeführten SSCP-Analysen wurden unter anderer Zielsetzung als zum Screening möglicher HCM-Patienten durchgeführt; denn bereits vor Durchführung der SSCP war durch direkte Sequenzierung bekannt, dass die DNA bestimmter Patienten Varianten enthält. Es sollte untersucht werden, ob Probanden, bei denen keine HCM bekannt war, ebenfalls Träger der Variante sind. Die SSCP wurde daher unter verschiedenen Temperaturbedingungen getestet, bis ein abweichendes Laufverhalten der Patienten-DNA gegenüber DNA auftrat, die nachweislich nicht die Variante enthielt.

So ist davon auszugehen, dass der hier verwendete Versuchsaufbau keinen Einfluss auf die Sensitivität haben sollte, nachdem die Bedingungen zum Darstellen der Variante geschaffen waren. Dennoch bietet auch diese Herangehensweise keine absolute Gewähr, Varianten nicht zu übersehen. Denn bei der Sequenzierung im Rahmen dieser Arbeit fiel auf, dass zwei Patienten Träger von Varianten waren (p.T1041X und p.Q1233X), die bei der SSCP von Erdmann et al. nicht gefunden wurden (34). In derselben Studie

konnte die SSCP aber identische Varianten bei anderen Patienten identifizieren. Die Ursache hierfür ist unklar. Möglicherweise lagen in der DNA der Patienten weitere Varianten vor, die die Ausbildung eines auffälligen Bandenmusters beeinflussten. Denkbar ist auch, dass die Versuchsbedingungen nicht konstant waren, wenn beispielsweise die Raumtemperatur während der Dauer der Experimentierphase schwankte.

### **4.3 Varianten in Exons des MYBPC3-Gens**

In allen hier zitierten Studien und in den für diese Arbeit verwendeten Computerprogrammen fanden sich keine Hinweise darauf, dass die nachfolgend genannten exonischen Varianten bereits beschrieben wurden. Es ist daher davon auszugehen, dass sie neu sind. Drei der Mutationen führen zu trunkierten Proteinen. Mutationen, die die Bildung von trunkierten Proteinen bewirken, sind die häufigsten Varianten des MYBPC3 bei Patienten mit HCM (148).

#### **4.3.1 Exon 11 C/A, p.S311X**

Eine 48-jährige Patientin aus dem Kollektiv war alleinige heterozygote Trägerin für diese Nonsense-Mutation in Exon 11. Anhand der Position des Triplets in der cDNA kann die Stelle vorausgesagt werden, an der das Stopcodon in der mRNA erscheint. Die Stelle befindet sich zwischen den Domänen C1 und C2 im MYBPC-Motiv (s. a. Abb. 1.9) (153). Die in Richtung des C-terminalen Ende liegenden Anteile des Proteins werden nicht synthetisiert, so dass ein trunkiertes Protein entsteht.

Nach Cotton et al. erfüllen Mutationen, die bei der Translation zu einem trunkierten Protein führen, ein wichtiges Kriterium für die Definition von pathogenen Mutationen (22). Dabei bleibt die Pathogenese, die den Weg vom trunkierten MYBPC3 zur HCM erklärt, unklar (9, 148).

Es konnte gezeigt werden, dass das MYBPC3 mit einer Nonsense-Mutation in einer Spleißdonorseite die mutierte mRNA exprimiert. In Myokardbiopsien konnte das erwartete defekte Protein jedoch nicht nachgewiesen werden (130). Bei einer anderen Mutation, die zu einer veränderten Spleißdonorseite im MYBPC3 führte, blieb der Nachweis des trunkierten Proteins ebenfalls aus (100). Eine Erklärung dafür, warum mutierte mRNA exprimiert wird, aber der Einbau ihrer Proteine in das Sarkomer nicht nachweisbar ist, kann ein vorzeitiger Abbau der trunkierten Proteine sein (35). Es ist auch möglich, dass die mutierte mRNA Strukturen ausbildet, die eine Translation unmöglich macht (13, 130). Eine weitere Hypothese geht dahin, dass das Ubiquitin-Proteasom-System maßgeblich am Abbau trunkierter MYBPC3 beteiligt ist, und dass diesem System eine Rolle bei der Pathogenese der HCM zukommt (131). Für den Fall eines vorzeitigen Abbaus von mutierter mRNA oder trunkierter Proteine könnte die HCM Folge veränderter Stoichiometrie der Sarkomerbestandteile bei Haploinsuffizienz sein (130). Unter Haploinsuffizienz versteht man das Unvermögen eines nicht veränderten Allels, den Funktionsausfall des mutierten Allels zu kompensieren.

Im Gegensatz zu der Beobachtung, dass trunkierte Proteine im Sarkomer menschlicher Kardiomyozyten nicht nachweisbar sind, stehen Tierversuche mit transgenen Mäusen. In diesen Versuchen waren sowohl trunkierte Proteine als auch ihr Einbau in das Sarkomer nachweisbar (162). Andere Autoren vermuten daher, dass trunkierte Proteine auch im Sarkomer erkrankter Menschen enthalten sind. Ihre Menge könne aber so gering sein, dass sie nicht nachweisbar ist. Diese geringe Menge mutierter Proteine könne ausreichen, einen dominant-negativen Effekt auszuüben, der den Phänotyp einer HCM bewirkt (41). Unter dominant-negativem Effekt versteht man, dass mutierte Proteine die Funktion des gesunden Allels stören.

Bei der Patientin mit der Nonsense-Mutation findet sich als echokardiographisches Korrelat zur HCM eine asymmetrische und mäßige Hypertrophie (IVS: 19 mm, HW: 12 mm). Die Patientin gibt als Beschwerden lediglich Dyspnoe an. Dieses Symptom ist typisch für eine HCM (157). Es kann aber auch Ausdruck einer anderen kardiologischen oder pulmonalen

Erkrankung sein. Die Patientin hatte die Beschwerden erstmals im Alter von 45 Jahren bemerkt.

Die Angaben der Anamnese stimmen mit den Beobachtungen überein, dass Patienten, die an einer HCM durch eine Mutation im MYBPC3 erkrankt waren, eine reduzierte Penetranz bis zur fünften Lebensdekade hatten und eine mildere Hypertrophie entwickelten als bei Mutationen anderer Sarkomerproteine (110).

Um zu belegen, dass die Mutation zum vorhergesagten trunkierten Protein führt, können in anschließenden Versuchen zunächst Sequenzanalysen der mRNA-Sequenz vorgenommen werden. In der mRNA-Sequenz müsste das mutierte Triplet nachweisbar sein.

Da die Patientin angibt, eine positive Familienanamnese zu haben, bietet sich ferner eine Stammbaum-Analyse mit Genotypisierung der Verwandten an, um eine Kosegregation des Merkmals zu überprüfen. Es sollte dabei der Frage nachgegangen werden, welche Familienmitglieder mit gleichem Genotyp den Phänotyp einer HCM ausbilden. Dabei ist zu beachten, dass die Penetranz der HCM durch MYBPC3-Mutationen altersabhängig sein kann. Ein Genotyp mit der Mutation schließt bei fehlender HCM nicht aus, dass sich im fortgeschrittenen Alter eine Hypertrophie entwickelt (110).

Die Patientin ist Trägerin einer weiteren Variante in Exon 28. Die Variante verursacht eine synonyme Substitution. Das bedeutet, dass das neu entstandene Codon sehr wahrscheinlich für dieselbe Aminosäure kodiert. Die Variante stellt daher einen harmlosen Polymorphismus dar, der die Struktur und Funktion des Proteins sehr wahrscheinlich nicht beeinflusst.

Die Patientin ist Trägerin sieben weiterer Varianten in Introns. Die Bedeutung intronischer Varianten wird ab Kapitel 4.4 beschrieben.

Es ist nicht bekannt, ob die Patientin Trägerin weiterer Mutationen in anderen Sarkomerproteinen ist.

### **4.3.2 Exon 14 ins (C), p.P452X**

Die Variante der 46-jährigen Patientin besteht aus einer heterozygoten Insertion eines Cytosinmoleküls in Exon 14. Die Insertion bewirkt einen *frame shift* mit Bildung eines vorzeitigen Stopcodons nach 21 Triplets. Wie in Kapitel 4.3.1 beschrieben, kann der Effekt des vorzeitigen Stopcodons sicherer beurteilt werden, wenn die Sequenz der mRNA untersucht wird.

Die Insertion und das daraus resultierende Stopcodon befinden sich beide in der Domäne C3 (153). Ab dieser Position wird das Protein bei der Translation nicht mehr weiter synthetisiert werden, so dass ein trunkiertes Protein entsteht.

Da die Variante relativ nahe zur vorher genannten Mutation liegt, ist ein ähnlicher Phänotyp zu erwarten. In beiden Fällen fehlen nämlich die Domänen des MYBPC3 zur Bindung an Myosin und Titin (41, 113). Somit sind die Strukturen zur physiologischen Verankerung des MYBPC3 in das Sarkomer nicht vorhanden. Tatsächlich aber befindet sich die Patientin im Zustand nach einer TASH. Derartige invasive Eingriffe werden nur bei stark symptomatischen und therapierefraktären Patienten mit HOCM vorgenommen (90). Auch wenn die Patientin zum Zeitpunkt der Blutentnahme nur eine mäßige Hypertrophie zeigte (IVS: 18 mm, HW: 14 mm), ist davon auszugehen, dass sie vor dem Eingriff eine stärkere Hypertrophie mit Obstruktion des Ausflusstrakts besaß. Ein SAM ist auch nach dem Eingriff weiter nachweisbar.

Die Anamnese der Patientin stimmt mit der Beobachtung überein, dass Patienten mit Mutationen im MYBPC3, die zu trunkierten Proteinen führen, häufiger einer konservativen Therapie gegenüber refraktär waren, als solche Patienten, die eine Missense-Mutation im Gen hatten (36).

Die Frage stellt sich, warum die Patientin trotz einer Nonsense-Mutation, die in relativer Nähe zu der vorbeschriebenen Variante steht, einen offensichtlich ausgeprägteren Phänotyp entwickelte. Eine Begründung hierfür kann sein, dass bei der Variante p.P452X funktionelle Elemente im trunkierten Protein vorhanden sind, die mit der Funktion eines „*poison peptide*“ die

Sarkomerfunktion beeinflussen können. Diese Hypothese steht aber im Widerspruch zu der Überlegung, dass trunkierte Proteine nicht exprimiert werden oder vorzeitig abgebaut werden. Deshalb ist auch denkbar, dass die Patientin Trägerin weiterer pathogener Mutationen in Sarkomerproteinen ist (engl. *double heterozygoty*). Man hat bei mehrfach heterozygoten Mutationsträgern festgestellt, dass ihr Phänotyp häufig ausgeprägter ist als bei Trägern nur einer Mutation (29, 126). Varianten in weiteren Sarkomergenen sind bei der Patientin nicht bekannt.

Die Patientin ist aber Trägerin einer Variante in Exon 6 des MYBPC3 (p.S236G). Die Variante wird in der Literatur als neutraler Polymorphismus bewertet (65). Auch wenn die Variante selbst nicht als pathogen gilt, ist zu berücksichtigen, dass auch Polymorphismen innerhalb von Sarkomerproteinen einen Einfluss auf die HCM haben könnten (155). Weitere sechs Varianten der Trägerin liegen in Introns. Ihre Bedeutung wird in Kapitel 4.4 besprochen.

Da auch die Familienanamnese dieser Patientin positiv ist, sind zur weiteren Diagnostik die bereits oben beschriebenen Verfahren empfehlenswert.

#### **4.3.3 Exon 25 C/G, p.T956S**

Die Variante wurde bei einem 57-jährigen Patienten gefunden. Sie besteht aus einer Substitution von Guanin gegen Cytosin in Exon 25.

Die Substitution bewirkt, dass das Triplet nun für die Aminosäure Serin anstelle von Threonin kodiert. Sowohl Serin als auch Threonin sind polare Aminosäuren mit ungeladenen Seitenketten. Die Folgen der Substitution für die Struktur und Funktion des MYBPC3 sind noch nicht klar. Wegen der ähnlichen chemischen Eigenschaften ist es unwahrscheinlich, dass die Struktur des Proteins und damit auch seine Funktion beeinflusst werden.

Der Aminosäureaustausch betrifft die Domäne C7 des MYBPC3 (153). Sie ist eine Fibronectindomäne. Die Funktion der Domäne ist unklar. Ihre Bindung mit der Domäne C10 wird diskutiert (41).

Die Auswirkungen von Missense-Mutationen auf das MYBPC3 sind offen.

Sie sollen aber wie Nonsense-Mutationen auch pathogen für eine HCM sein (101, 111). Es ist vorstellbar, dass Proteine mit einer Missense-Mutation in das Sarkomer eingebaut werden, da sie die Proteingröße nicht beeinflussen. Hier könnten sie wie „*poison peptides*“ wirken, indem sie die normale Funktion des Sarkomers stören (41). Wegen der Ähnlichkeit der beiden Aminosäuren ist jedoch fraglich, ob in diesem Fall überhaupt ein pathogener Effekt vom mutierten Protein ausgeht. Es könnte sich daher auch um einen neutralen Polymorphismus handeln. Um diese These zu bestätigen, könnten DNA-Kontrollen gesunder Probanden untersucht werden. Sollte sich hierbei dieselbe Variante bei nicht erkrankten Probanden finden, ist dies ein Indiz für das Vorliegen eines neutralen Polymorphismus.

Der Patient ist nicht Träger weiterer exonischer Varianten im MYBPC3. Andere Sarkomerproteine könnten daher ursächlich für seine Erkrankung sein, wenn die gefundene Variante ein Polymorphismus ist.

Im Gegensatz zu den bisher zitierten Beobachtungen gibt es auch Erkenntnisse, nach denen sich Missense-Mutationen hinsichtlich des Phänotyps und der Notwendigkeit für invasive Maßnahmen nicht voneinander unterscheiden (29). Für den Patienten dieser Variante können hierzu keine Angaben gemacht werden. Es lagen von ihm nur unvollständige Datensätze vor.

Da die Familienanamnese des Patienten positiv ist, kann eine Kopplungsanalyse helfen, einen genetischen Fokus für die HCM auch an anderer Stelle im Genom zu finden.

Der Patient ist Träger einer weiteren intronischen Variante. Ihre Bedeutung wird ab Kapitel 4.4 erläutert.

#### **4.3.4 Exon 28 del (G), p.G1078X**

Ein 35-jähriger Patient ist Träger der Deletion in Exon 28. Die Deletion führt zunächst zu einer veränderten Tripletzzusammensetzung stromabwärts in der mRNA. Nach 109 Triplets kommt es zur Bildung eines vorzeitigen Stop-

codons in Höhe von Exon 30. An der Position des Stopcodons befindet sich im Protein die Domäne C10 (153).

Da 86% Prozent der Aminosäuren der Domäne C9 durch die Deletion verändert wurden, ist ein Funktionsverlust der Domäne wahrscheinlich. Die Domäne C10 dürfte vollständig fehlen. Nach Oakley et al. soll ihre Funktion die Bindung an Myosin und Titin sein (111). Der Verlust der Struktur könnte eine Einbindung in das Sarkomer unmöglich machen. Es ist denkbar, dass das Protein dennoch in das Sarkomer eingebaut wird, da zusätzliche Strukturen zur Bindung an Myosin weiterhin vorhanden sind (111). Der Nachweis vom Einbau trunkierter Proteine kann durch eine Biopsie von Myokard mit dem Nachweis der Proteine erfolgen.

Die Hypertrophie dieses Patienten ist verglichen mit den anderen Patienten stärker ausgeprägt. Er leidet an einer belastenden Symptomatik mit Dyspnoe und pectanginösen Beschwerden. Er befindet sich im Zustand nach einer TASH. Im EKG sind Zeichen eines Vorhofflimmerns zu finden. Die Echokardiographie zeigt Werte für das IVS von 23 mm und für die HW von 13 mm. Das Alter der Erstmanifestation ist mit 35 Jahren im Vergleich zu den bisher besprochenen Erkrankten deutlich jünger. Der Befund verdeutlicht, dass die Ausprägung des Phänotyps der HCM durch Sarkomerproteine deutlich heterogen ist. Eine Beteiligung weiterer Varianten in anderen Genen kann nicht ausgeschlossen werden.

Die Familienanamnese des Patienten ist, soweit bekannt, negativ.

Der Patient ist weiterhin Träger zweier intronischer Mutationen. Ihre Bedeutung wird im folgenden Kapitel erklärt.

#### **4.4 Intronische Varianten des MYBPC3-Gens**

Die Untersuchung der DNA von 44 Patienten, die an einer HCM erkrankt sind, zeigte insgesamt 27 verschiedene Varianten in den Intronsequenzen des MYBPC3. Im Vergleich dazu fanden sich 20 exonische Varianten des Gens in demselben Kollektiv. Die beobachtete Mutationsrate liegt damit für Introns mit 61,4% höher als für Exons mit 45,5%. Dabei ist zu bedenken, dass die

Intronsequenzen nicht vollständig sequenziert wurden. Ihre tatsächliche Mutationsrate könnte noch größer sein.

Ziel der Arbeit ist es, Varianten in Introns zu finden, die Einfluss auf den Phänotyp einer HCM haben können. Eine solche Variante stellen die Mutationen in der Spleißakzeptorstelle von Intron 11 dar (Intron 11 -2 A/G). Eine weitere intronische Variante mit mutmaßlicher pathologischer Bedeutung ist ebenfalls in Intron 11 gefunden worden (Intron 11 -111 G/T). Eine Variante mit möglichem Einfluss auf den Phänotyp befindet sich in einem stark konservierten Areal in Intron 32 (Intron 32 -91 G/A).

Die darüber hinaus gefundenen Varianten werden als unwahrscheinliche Ursache einer HCM eingestuft. Im Folgenden soll die genauere Bedeutung der intronischen Variante interpretiert werden.

#### **4.4.1 Int. 11 -2 A/G: Spleißstellenmutation mit Bedeutung für den Phänotyp einer HCM**

Bei zwei Patienten im Patientenkollektiv fand sich eine Veränderung im Bereich einer Spleißakzeptorstelle von Intron 11.

Das Dinukleotid AG einer Spleißakzeptorstelle ist von entscheidender Bedeutung für den Spleißvorgang. Für den regelrechten Spleißvorgang muss ein sog. GU-AU-Spleißosom die Kennsequenz für die Spleißstellen aufsuchen (143). Bei Fehlen oder Veränderung der Sequenz ist eine Bindung an diese Stelle nicht möglich. Zwei Folgen sind denkbar. Zum einen kann das Intron beibehalten werden und bei der Translation mit übersetzt werden (engl. *intron retention*). Zum anderen ist es möglich, dass die nächstliegende Akzeptorstelle zum Spleißen benutzt wird. Neben dem Intron würde auch das folgende Exon beim Spleißen entfernt werden (engl. *exon skipping*) (144).

Das Beibehalten von Introns hat zur Folge, dass die mRNA den Zellkern zur Translation im Plasma nicht verlassen kann (81). Gelingt es gleichwohl, dass die mRNA an den Ribosomen translatiert wird, sind sowohl für den Fall der „*intron retention*“ als auch des „*exon skipping*“ fehlerhafte Translationen zu erwarten, die meist in einem trunkierten Protein münden. Für andere

Mutationen der Spleißakzeptorseite im MYBPC3-Gen konnte bereits ein „*exon skipping*“ und eine Assoziation mit der HCM nachgewiesen werden (8). Zum Nachweis, dass es sich bei der Variante um eine Mutation handelt und nicht um einen der häufigeren Polymorphismen, wurde mittels SSCP das Fragment mit der Variante mit DNA gleicher Position von 432 Chromosomen verglichen. Nur die Patienten mit der Variante zeigten ein charakteristisches Wanderungsverhalten der Banden. Definitionsgemäß handelt sich bei den veränderten Spleißakzeptorstellen daher um eine Mutation.

Wie sich erst im Verlauf der Arbeit herausstellte, ist eine Variante an identischer Position bereits entdeckt und publiziert worden (dort IVS12 -2 A/G genannt) (110). Die Nomenklatur des Gens und die Positionsangaben von DNA und cDNA sind in Studien zur HCM nicht einheitlich und haben in der Vergangenheit zu Doppelnennungen von Varianten geführt (60). Es existieren daher vermutlich weniger Varianten im MYBPC3, wenn alle Doppelnennungen aufgedeckt werden.

Niimura et al. konnten nachweisen, dass die Variante IVS12 -2 G/A das vorhergesagte abweichende Spleißmuster der mRNA zeigt (110).

Es konnte weiter gezeigt werden, dass die Mutation in insgesamt zwei Familien eine HCM verursacht hatte. Beide Familien zeigten einen gemeinsamen Haplotyp. Es wurde der Verdacht vom Vorliegen einer *Founder Mutation* bei den Familien geäußert (110).

Die Familienanamnese eines Patienten aus der vorliegenden Arbeit ist negativ. Es liegt bei ihm wahrscheinlich eine sporadische Mutation vor. Der andere Patient hat eine positive Familienanamnese.

Die echokardiographischen Befunde sind heterogen. Während ein Patient eine vergleichsweise ausgeprägte Hypertrophie (IVS 30 mm, HW 15 mm) mit Dyspnoe entwickelt hat, ist der andere Patient asymptomatisch und hat eine mildere Hypertrophie (IVS 20 mm, HW 11 mm). Letztgenannter Patient ist 20 Jahre jünger. Ein Progress der Hypertrophie ist bei ihm vorstellbar.

Bei beiden Patienten wurden ICD-Schrittmacher implantiert.

Schrittmacher wurden nur dann bei Patienten aus dem Kollektiv eingesetzt, wenn mindestens einmal lebensbedrohliche symptomatische Tachyarrhythmien vorgekommen waren. Es kann daher vermutet werden, dass diese

Variante mit einer erhöhten Mortalität durch SCD bei Tachyarrhythmien assoziiert ist.

Der Fund der Mutation zeigt, dass es sinnvoll ist, bei der Suche nach pathologischen Varianten neben den Exons auch die Übergänge zu den Introns zu untersuchen. Nicht nur die Dinukleotide der Spleißakzeptor- und Spleißdonorseite, sondern auch die benachbarten Nukleotide der Konsensus-Sequenz in Richtung des Introns können bei Veränderung den Spleißvorgang beeinflussen. Auch die Regionen, die sich an die Konsensus-Sequenzen der Spleißstellen in unterschiedlicher Länge anschließen, können Einfluss auf Erkrankungen haben. So sollen veränderte Polythymidinregionen in Introns Auswirkungen auf den Phänotyp einer zystischen Fibrose haben (77).

#### **4.4.2 Int. 11 -111 G/T: tiefe intronische Mutation als Ursache für HCM**

Ein Patient aus dem Kollektiv zeigte 111 Nukleotide vom folgenden Exon entfernt eine intronische Variante mit einer heterozygoten Substitution von Thymin. Folge des Basenaustausches ist eine Sequenz, die nur in einer Position von der Sequenz der natürlichen Spleißdonorstelle am Übergang zwischen Intron und Exon abweicht, so dass sich hier eine kryptische Spleißstelle gebildet haben kann.

In der Literatur werden Fälle von Tuberosklerose und Ataxia Teleangiektasia beschrieben, in denen die Aktivierung derartiger kryptischer Spleißdonorstellen zu einem Phänotyp führen könnten (19, 95).

Zwar entspricht die hier gefundene Sequenz mit der Variante nicht vollständig der Konsensus-Sequenz der Spleißdonorseite. Eine Aktivierung ist aber dennoch möglich, da die natürlichen benachbarten Spleißdonorstellen geringere Übereinstimmungswerte mit der Konsensus-Sequenz aufweisen. Überdies kann gezeigt werden, dass eine Aktivierung einer kryptischen Spleißakzeptorseite im MYBPC3 auch bei nicht vollständiger Übereinstimmung wirksam sein kann (65).

Der Beweis für fehlerhaftes Spleißen durch Aktivierung kryptischer Spleißstellen kann durch eine Analyse von cDNA oder mRNA erfolgen. Derartige Untersuchungen konnten bei diesem Patienten nicht durchgeführt werden. Die Vorräte seiner DNA waren im Rahmen der Arbeiten zur Sequenzierung erschöpft. Es war bis zum Abschluss der Arbeit nicht möglich gewesen, eine weitere Blutprobe des Patienten zu beschaffen.

Es ist aber daraufhinzuweisen, dass die Ergebnisse der mRNA-Untersuchungen keine allgemeine Gültigkeit für alle Patienten mit derselben Variante hätten. So konnten im Zusammenhang mit Melanomen, die mit Aktivierung einer kryptischen Spleißdonorstelle assoziiert sind, festgestellt werden, dass trotz identischer Mutation unterschiedliches Spleißverhalten bei den einzelnen Patienten auftrat (54).

Für die HCM ist dies der vermutlich erste entdeckte Fall, bei dem eine Mutation eine Aktivierung einer kryptischen Spleißdonorseite in einem Intron bewirkt.

Dafür, dass 12 Jahren nach Entdeckung des MYBPC3 als Locus für eine HCM erst jetzt eine kryptische Spleißdonorstelle in einem Intron des Gens entdeckt wurde, gibt es verschiedene Erklärungsmöglichkeiten. Zum einen sollen Mutationen, die eine Änderung des Spleißens bewirken, selten sein. Sie sollen nur 15% aller pathogenen Mutationen ausmachen (54, 75). Eine weitere Erklärung für die geringe Zahl bisher gefundener kryptischer Spleißstellen in Introns von Sarkomergenen ist vermutlich die Fokussierung auf exonische Sequenzen bei der Suche nach HCM-Mutationen.

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass intronische Sequenzen eine höhere Mutationsrate als exonische Sequenzen haben. Wenn diese Beobachtung grundsätzlich für die Mutationsrate des MYBPC3 zutrifft, ist es wahrscheinlich, dass weitere kryptische Spleißstellen existieren, die durch Varianten aktiviert werden. Kryptische Spleißstellen sind dann als eine häufige Ursache einer HCM denkbar.

Im Falle der Ataxia Teleangiektasia bilden Patienten mit Mutationen, die kryptische Spleißstellen aktivieren, einen milderen Phänotyp aus, als

Patienten mit Mutationen einer veränderten Exonsequenz. Als Ursache wird eine teilweise erhaltene Funktion des mutierten Allels mit normaler Wildtyp-Spleißfunktion angenommen (19, 149). Bei dem untersuchten Patienten sprechen jedoch die Herzschowerte (IVS 32 mm, HW 16 mm), der Zustand nach Myektomie und die Symptome dagegen, dass es sich um eine milde Form der HCM handelt. Es ist daher vorstellbar, dass bei ihm das mutierte Allel keine normale Wildtyp-Spleißfunktion mehr besitzt.

Auch im Falle der tief intronischen Mutation, die mit Melanomen assoziiert ist, konnte keine Verminderung der Penetranz festgestellt werden (54). Die Familienanamnese des Patienten mit HCM ist unbekannt, so dass zur Penetranz keine vergleichenden Aussagen gemacht werden können.

Der Patient ist Träger weiterer intronischer Mutationen, die das Spleißen vermutlich nicht beeinflussen. Zudem ist er Träger einer synonymen exonischen Mutation (p.E1095E). Sie dürfte keinen Einfluss auf den Phänotyp haben.

#### **4.4.3 Weitere Intronvarianten**

Die übrigen gefundenen Intronvarianten sind wahrscheinlich bedeutungslos für den Phänotyp einer HCM. Eine zuverlässige Einschätzung ihrer genauen Bedeutung ist allerdings schwieriger als bei exonischen Varianten. Denn typische Kennsequenzen wie die der Spleißstellen sind für funktionell bedeutsame Intronelemente bislang kaum bekannt. Zudem ist es unbekannt, ob funktionelle Elemente überhaupt mehrfach in nicht kodierender DNA vorhanden sind. Überdies ist offen, ob derartige Sequenzen einzigartig im Genom sind (5).

Die Deutung möglicher Konsequenzen von intronischen Varianten wird zusätzlich durch das unvollständige Verständnis der Intronfunktion erschwert (114). Hypothesen, nach denen Introns bedeutungslos für die Proteinsynthese sind, gelten jedoch mittlerweile als widerlegt.

Einzelnen Introns wird inzwischen eine Rolle bei der Genregulation

zugeschrieben (138). Beispielsweise können Introns Sequenzen enthalten, die cis-regulatorische Elemente bestimmter Gene darstellen (7, 109). Bei diesen Elementen handelt es sich um Sequenzen, die durch Interaktion mit weiteren Strukturen die Transkription beeinflussen.

Ebenso ist erwiesen, dass Introns auch für Sequenzen von regulatorischer miRNA kodieren. MiRNAs sind Moleküle einer Größe von etwa 22 Nukleotiden. Sie können die Genexpression einschränken (2). In der Literatur wird bemerkt, dass einzelne Introns für Proteine kodieren können (146). Auch die mögliche Rolle von Introns als alternative Promotoreregionen in einem bestimmten Gen wird diskutiert. Diese Vermutung bestätigt sich aber offenbar nicht (147).

Ferner kann vermutet werden, dass Introns neben den beschriebenen Funktionen weitere bislang unbekannte Aufgaben bei der Genexpression übernehmen.

Unter Berücksichtigung der bisher bekannten Funktionen in Introns ist vorstellbar, dass Änderungen in Intronsequenzen zur Funktionsbeeinflussung der Genexpression führen. Die veränderte Genexpression kann die Ausbildung von Phänotypen beeinflussen.

Neben Veränderungen, die funktionelle Elemente der Introns beeinflussen, ist auch denkbar, dass durch Varianten strukturelle Änderungen der mRNA entstehen, die weitere Schritte der Proteinsynthese, wie den Transport zu den Ribosomen, die Regulation des Spleißens oder die Bindung von mRNA an Ribosomen beeinflussen.

#### **4.4.4 Auffinden funktioneller Sequenzen in Introns**

Eine suffiziente Methode, funktionelle Elemente in nicht kodierender DNA aufzuspüren, ist der Sequenzvergleich mit DNA unterschiedlicher Tierspezies (53, 64, 122). Sequenzhomologie zwischen menschlicher und tierischer DNA gilt als während der Evolution konserviertes Erbmateriale mit funktioneller Bedeutung. Homologe Sequenzen wurden im Gegensatz zu neutralen Sequenzen bewahrt, die einer raschen Veränderung unterlagen.

Die Suche nach konservierten Sequenzen wird entscheidend von der Art der zu vergleichenden Spezies beeinflusst. So zeigen Mensch und Fugu (Kugelfisch) als phylogenetisch wenig verwandte Lebewesen relativ wenige gemeinsame Sequenzen. Dabei wird angenommen, dass auch funktionell bedeutsame Sequenzen im Laufe der Evolution verändert worden sind (122). Im Gegensatz dazu ist beim Vergleich mit DNA menschlicher Primaten eine hohe Übereinstimmung an Sequenzen zu erwarten. Die große Homologie macht die Unterscheidung zwischen funktionell bedeutender und unbedeutender DNA aber problematisch, weil auch funktionell unbedeutende Elemente sich während der Evolution nicht verändert haben können (122).

In der Literatur werden zwei Möglichkeiten angegeben, Sensitivität und Spezifität für Homologien zu optimieren. Zunächst kann eine ausreichend große Sequenzlänge gewählt werden, die übereinstimmend sein muss (6, 160). So werden nur Homologien als konserviert gewertet, die eine ausreichende Sequenzlänge betreffen. Es ist jedoch bekannt, dass cis-Elemente sehr kurz sein können und nur aus wenigen Nukleotiden bestehen können. Solche cis-Elemente sind u. a. die TATA-Box oder die GC-Box. Sie bestehen aus nur fünf bzw. sechs bp. Zudem gibt es im MYBPC3 sehr kurze Introns. Bei der hier verwendeten Arbeit wurde beim Homologievergleich die Konservierungen deshalb für jede einzelne Base angezeigt. So war es möglich, auch sehr kurze konservierte Elemente darzustellen.

Das Erkennen konservierter und damit eventuell funktioneller Sequenzen kann darüber hinaus verbessert werden, wenn ein gleichzeitiger Abgleich mit mehreren Spezies vorgenommen wird (engl. *multi species alignment*). Funktionell unbedeutende Sequenzen dürften dann im Laufe der Evolution ausgeglichen worden sein (160).

Der Vergleich intronischer Sequenzen des MYBPC3 erfolgte bei dieser Arbeit mit orthologen Sequenzen desselben Gens von 27 Wirbeltieren. Die große Anzahl verglichener Sequenzen dürfte daher geeignet sein, auch Sequenzübereinstimmungen mit sehr fern verwandten Spezies zu entdecken.

Der Meinung Rechnung tragend, dass ein geeigneter Vergleich menschlicher DNA nur mit Säugetieren möglich sei, weil andere Wirbeltiere genetisch zu

divergent seien, wurde die Homologie für die Säugetiere der 27 Wirbeltiere auch getrennt untersucht (20).

Die Homologie der intronischen Sequenzen, innerhalb derer sich die Varianten der Patienten befinden, zeigte, dass keine Variante in einem Bereich lag, der ähnlich stark konserviert war wie der der Exons. Eine Veränderung funktioneller Intronsequenzen ist daher als sehr unwahrscheinlich anzusehen.

Die Betrachtung von Arealen in Introns, die keine Variante enthielten, zeigte allerdings, dass derartige stark konservierte Sequenzen im Gen durchaus vorliegen.

Varianten, die diese stark konservierten Sequenzen verändern, könnten Einfluss auf die Ausbildung des Phänotyps haben.

Die Vermutung, dass die gefundenen intronischen Varianten unbedeutend sind, wird durch die Beobachtung unterstützt, dass die meisten Intronvarianten bei vielen Patienten zu finden waren. Häufig lagen die Varianten homozygot vor. Es erscheint daher wahrscheinlicher, hier neutrale Polymorphismen und keine Mutationen gefunden zu haben.

Eine Ausnahme stellte die Variante in Position -2 des Exon 11 dar. Die Variante befindet sich in einer Intronsequenz, die beinahe ebenso stark wie das flankierende kodierende Areal konserviert ist. Der Befund unterstützt die These, dass konservierte Sequenzen funktionell bedeutsam sind und ihre Veränderung pathogen sein kann. Zudem zeigt die Mutation, dass die Substitution eines einzelnen Nukleotids pathogen sein kann.

Lediglich ein weiterer Patient wies eine Variante auf, die in einem Bereich lag, der unter Säugetieren eine auffällige Konservierung zeigt (Intron 32 -91 G/A). Mit SSCP konnte gezeigt werden, dass es sich bei der Variante um eine Mutation handelt. Die Konsequenz der Variante für den Phänotyp kann nur geschätzt werden, da nicht bekannt ist, welche Funktion dieser Abschnitt übernimmt, und ob seine Funktion beeinflusst wird.

Weitere Untersuchungen der mRNA können Hinweise auf eine qualitativ oder

quantitativ veränderte Genexpression geben. Eine weitere Möglichkeit, die Bedeutung der intronischen Mutation abzuschätzen, ist der selektive *Knock down* der betroffenen Intronsequenz im Transkript mit sog. „Morpholintechnik“ (59). Am Tiermodell ließen sich so direkt die Konsequenzen aus dem Funktionsverlust für den Phänotyp studieren.

Im Falle des erwähnten Patienten besteht beim Nachweis auf Ebene der mRNA das Problem, dass er gleichzeitig Träger der Variante Intron 11 -2 A/G ist. Die Variante führt in jedem Fall zu veränderter mRNA-Bildung.

Bei der Interpretation von Homologievergleichen sollte beachtet werden, dass eine Konservierung von Sequenzabschnitten bei vielen Spezies nicht uneingeschränkt als Charakteristikum für Funktionalität angesehen werden kann; auch solche Sequenzen können funktionell bedeutsam sein, die bei sehr nahen Verwandten einer Spezies fehlen und somit nicht konserviert sind (42). Deshalb kann nicht ausgeschlossen werden, dass die gefundenen intronischen Varianten trotz fehlender Konservierung gleichwohl Einfluss auf den Phänotyp haben. Schließlich sollten Hinweise darauf berücksichtigt werden, dass ein gesundheitsschädigender Effekt tendenziell eher von mehreren Mutationen in nicht kodierender DNA abhängt, als von einer einzelnen (76).

#### **4.5 Schlussfolgerung**

Die Rolle des MYBPC3 innerhalb des Sarkomers ist nicht abschließend geklärt. Die bislang vorgenommenen Experimente geben Anlass zu der Vermutung, dass es eine komplex-regulierte Rolle bei der Sarkomerfunktion einnimmt.

Für die Pathogenese der HCM durch Mutationen im MYBPC3-Gen existieren verschiedene Erklärungsmodelle. Unstrittig ist jedenfalls der Zusammenhang von Mutationen im MYBPC3-Gen und der Ausbildung einer HCM.

Bei klinischem Verdacht auf eine HCM werden bislang aus wissenschaftlichem Interesse Screeningverfahren zur Mutationssuche

angewendet. Dabei ist als Methode u. a. die SSCP in großen Studien verwendet worden. Die SSCP ist zwar prinzipiell ein hoch sensitives Verfahren. Ihre Verlässlichkeit ist aber vom Versuchsaufbau abhängig. Dies konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit bestätigt werden, indem durch direkte Sequenzierung Varianten gefunden wurden, die in zuvor durchgeführter SSCP nicht entdeckt wurden. Drei der Varianten liegen in Exons. Sie sind vermutlich pathogen für eine HCM. Zum Nachweis müssen aber weitere Untersuchungen durchgeführt werden. Zwei weitere Varianten betreffen eine Spleißstelle. Sie sind nachgewiesen ursächlich für eine HCM. Es sollte beachtet werden, dass durch SSCP in zurückliegenden Studien Varianten vermutlich übersehen worden sind. Die Beziehungen zwischen Genotyp und Phänotyp müssten mit Blick darauf neu interpretiert werden.

Die Funktion der Introns ist bislang nicht vollständig geklärt. Es existieren jedoch intronische Mutationen, die einen Phänotyp einer HCM verursachen können. Sie verändern Spleißstellen oder aktivieren kryptische Spleißstellen. Zwei derartige Varianten wurden im Rahmen der Arbeit gefunden. Im Fall der kryptischen Spleißstelle sind weitere Untersuchungen notwendig, um deren tatsächlichen Effekt festzustellen.

Die weiteren gefundenen intronischen Varianten haben wahrscheinlich keinen Einfluss auf den Phänotyp einer HCM. Sie liegen in Bereichen des Gens, die gering konserviert sind. Vermutlich kommt es daher zu keiner Sequenzänderung eines funktionellen Elements.

Solange die Funktion einzelner Intronabschnitte in Genen weiterhin unklar ist, ist das *Multi Sequence Alignment* eine Möglichkeit, funktionelle Sequenzen in Form konservierte Areale zu finden.

Gegen eine Bedeutung der übrigen intronischen Varianten für den Phänotyp einer HCM spricht zudem, dass die meisten Varianten mehrfach gefunden worden. Die große Häufigkeit spricht für das Vorliegen eines eher neutralen Polymorphismus. Das Vorliegen pathogener intronischer Mutationen kann dennoch nicht völlig ausgeschlossen werden, da auch nicht konservierte Areale funktionell bedeutsam sein können. Eventuell hat auch ein kumulativer Effekt mehrerer intronischer Varianten Auswirkungen auf den Phänotyp.

Die weiteren Untersuchungsergebnisse haben Bedeutung für die Screening-Strategien bei klinisch begründetem Verdacht auf HCM. Zunächst sollten die am häufigsten betroffenen Sarkomergene auf Varianten untersucht werden. Hierzu gehört auch das MYBPC3-Gen. Der Fund einer Mutation sollte zumindest bei ausgeprägter HCM kein Grund sein, das Screening zu beenden. Wegen der Möglichkeit einer mehrfachen Heterozygotie oder des Einflusses von Polymorphismen sollte ausgeschlossen werden, dass weitere Mutationen vorliegen. Aus gleichem Grund sollte im Falle einer familiären HCM mit bekannter Mutation nicht nur nach der bereits bekannten Mutation gesucht werden.

Empfehlenswert ist die direkte Sequenzierung von DNA. Sie stellt den Goldstandard zum Auffinden von Varianten dar. Die Gefahr, bei der SSCP Varianten zu übersehen, ist groß.

Die vorliegende Arbeit bestätigt zudem, dass die Sequenzierung der Intron-Exon-Übergänge zum Ausschluss von Spleißmutationen ebenfalls nötig ist.

Als Ergebnis der Arbeit ist festzuhalten, dass bei Verdacht auf HCM, im Gegensatz zu anderen Erkrankungen, die Suche nach tiefen intronischen Mutationen derzeit nicht erforderlich erscheint.

## **5. Anhang**

### **5.1 Quellenverzeichnis**

(1) Alders M, Jongbloed R, Deelen W, van den Wijngaard A, Doevendans P, Ten Cate F, Regitz-Zagrosek V, Vosberg HP, van Langen I, Wilde A, Dooijes D, Mannens M. The 2373insG mutation in the MYBPC3 gene is a founder mutation, which accounts for nearly one-fourth of the HCM cases in the Netherlands. *Eur Heart J*, 24(20): 1848-53 (2003)

(2) Ambros V, Lee RC, Lavanway A, Williams PT, Jewell D. MicroRNAs and other tiny endogenous RNAs in *C. elegans*. *Curr Biol*, 13(10): 807-18 (2003)

(3) Applied Biosystems: Protokoll „VariantSEqr™ and mitoSEqr™ Resequencing Systems“  
<http://docs.appliedbiosystems.com/pebiiodocs/04344468.pdf>  
(Tag des Zugriffs: 02. 09. 2007)

(4) Arad M, Maron BJ, Gorham JM, Johnson WH Jr, Saul JP, Perez-Atayde AR, Spirito P, Wright GB, Kanter RJ, Seidman CE, Seidman JG. Glycogen storage diseases presenting as hypertrophic cardiomyopathy. *N Engl J Med*, 352(4): 362-72 (2005)

(5) Bejerano G, Haussler D, Blanchette M. Into the heart of darkness: large-scale clustering of human non-coding DNA. *Bioinformatics*, 20 (1): 40-8 (2004)

(6) Bejerano G, Pheasant M, Makunin I, Stephen S, Kent WJ, Mattick JS, Haussler D. Ultraconserved elements in the human genome. *Science*, 304(5675): 1321-5 (2004)

(7) Beohar N, Kawamoto S. Transcriptional regulation of the human nonmuscle myosin II heavy chain-A gene. Identification of three clustered cis-elements in intron-1 which modulate transcription in a cell type- and differentiation state-dependent manner. *J Biol Chem*, 273(15): 9168-78 (1998)

(8) Bonne G, Carrier L, Bercovici J, Cruaud C, Richard P, Hainque B, Gautel M, Labeit S, James M, Beckmann J, Weissenbach J, Vosberg HP, Fiszman M, Komajda M, Schwartz K. Cardiac myosin binding protein-C gene splice acceptor site mutation is associated with familial hypertrophic cardiomyopathy. *Nat Genet*, 11(4): 438-40 (1995)

(9) Bonne G, Carrier L, Richard P, Hainque B, Schwartz K. Familial hypertrophic cardiomyopathy: from mutations to functional defects. *Circ Res*, 3(6): 580-93 (1998)

(10) Bonow RO. Left ventricular diastolic function in hypertrophic cardiomyopathy. *Herz*, 16(1): 13-21 (1991)

- (11) Braunwald E, Waigand J, Dietz R: Kardiovaskuläre Erkrankungen: Normale und gestörte Myokardfunktion. In Dietel M, Dudenhausen, Suttrop N: *Harrisons Innere Medizin*, S. 1441f, 15. Aufl., ABW Wissenschaftsverlag, Berlin, 2002
- (12) Briguori C, Betocchi S, Romano M, Manganelli F, Angela Losi M, Ciampi Q, Gottilla R, Lombardi R, Condorelli M, Chiariello M. Exercise capacity in hypertrophic cardiomyopathy depends on left ventricular diastolic function. *Am J Cardiol*, 84(3): 309-15 (1999)
- (13) Brown EJ, Schreiber SL. A signaling pathway to translational control. *Cell*, 86(4): 517-20 (1996)
- (14) Budowle B, Chakraborty R, Giusti AM et al. Analysis of the VNTR locus D1S80 by the PCR followed by high-resolution PAGE. *Am J Hum Genet*, 48(1): 137-44 (1991)
- (15) Carrier L, Hengstenberg C, Beckmann JS, Guicheney P, Dufour C, Bercovici J, Dausse E, Berebbi-Bertrand I, Wisnewsky C, Pulvenis D, Fetler L, Vignal A, Weissenbach J, Hillaire D, Feingold J, Bouhour JB, Hagege A, Desnos M, Isnard R, Dubourg O, Komajda M, Schwartz K. Mapping of a novel gene for familial hypertrophic cardiomyopathy to chromosome 11. *Nature Genetics*, 4: 311-3 (1993)
- (16) Charron P, Carrier L, Dubourg O, Tesson F, Desnos M, Richard P, Bonne G, Guicheney P, Hainque B, Bouhour JB, Mallet A, Feingold J, Schwartz K, Komajda M. Penetrance of familial hypertrophic cardiomyopathy. *Genet Couns*, 8(2): 107-14 (1997)
- (17) CHIP Bioinformatic Tool: <http://snpper.chip.org/>  
(mehrfacher Zugriff: zuletzt im Oktober 2006)
- (18) Codd MB, Surgrue DD, Gersh BJ, Melton LJ. Epidemiology of idiopathic dilated and hypertrophic cardiomyopathy. A population-based study in Olmsted County, Minnesota, 1975-84. *Circulation*, 80: 564-72 (1989)
- (19) McConville CM, Stankovic T, Byrd PJ, McGuire GM, Yao QY, Lennox GG, Taylor MR. Mutations associated with variant phenotypes in ataxia-telangiectasia. *Am J Hum Genet*, 59(2): 320-30 (1996)
- (20) Cooper GM, Brudno M; NISC Comparative Sequencing Program, Green ED, Batzoglou S, Sidow A. Quantitative estimates of sequence divergence for comparative analyses of mammalian genomes. *Genome Res*, 13(5): 813-20 (2003)
- (21) Corrado D, Basso C, Schiavon M, Thiene G. Screening for hypertrophic cardiomyopathy in young athletes. *N Engl J Med*, 339(6): 364-9 (1998)
- (22) Cotton RG, Scriver CR. Proof of "disease causing" mutation. *Hum Mutat*, 12(1): 1-3 (1998)

- (23) Daehmlow S, Erdmann J, Knueppel T, Gille C, Froemmel C, Hummel M, Hetzer R, Regitz-Zagrosek V. Biochem Biophys Res Commun. Novel mutations in sarcomeric protein genes in dilated cardiomyopathy. *Biochem Biophys Res Commun*, 298(1): 116-20 (2002)
- (24) Davies MJ, McKenna WJ. Hypertrophic cardiomyopathy: an introduction to pathology and pathogenesis. *Br Heart J*, 72(6): 2-3 (1994)
- (25) Deinum J, van Gool JM, Kofflard MJ, ten Cate FJ, Danser AH. Angiotensin II type 2 receptors and cardiac hypertrophy in women with hypertrophic cardiomyopathy. *Hypertension*, 38(6): 1278-81 (2001)
- (26) Denk H, Zatloukal K: Zell- und Gewebereaktion: Adaptation, Zellschädigung, Zelltod. In Böcker W, Denk H, Heitz PhU: Pathologie, S. 51, 2. Aufl., Urban & Fischer, München, 2001.
- (27) Díez J, Querejeta R, López B, González A, Larman M, Martínez Ubago JL. Losartan-dependent regression of myocardial fibrosis is associated with reduction of left ventricular chamber stiffness in hypertensive patients. *Circulation*, 105(21): 2512-7 (2002)
- (28) van Driest SL, Ommen SR, Tajik AJ, Gersh BJ, Ackerman MJ. Sarcomeric genotyping in hypertrophic cardiomyopathy. *Mayo Clin Proc*, 80(4): 463-9 (2005)
- (29) Van Driest SL, Vasile VC, Ommen SR, Will ML, Tajik AJ, Gersh BJ, Ackerman MJ. Myosin binding protein C mutations and compound heterozygosity in hypertrophic cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol*, 44(9): 1903-10 (2004)
- (30) Einheber S, Fischman DA. Isolation and characterization of a cDNA clone encoding avian skeletal muscle C-protein: an intracellular member of the immunoglobulin superfamily. *Proc Natl Acad Sci USA*, 87(6): 2157-61 (1990)
- (31) Ellison J, Dean M, Goldman D. Efficacy of fluorescence-based PCR-SSCP for detection of point mutations. *Biotechniques*, 15(4): 684-91 (1993)
- (32) Ensembl Genome Browser: [www.ensembl.org](http://www.ensembl.org)  
(mehrfacher Zugriff: zuletzt im September 2007)
- (33) Epstein SE, Rosing DR. Verapamil: its potential for causing serious complications in patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation*, 64(3): 437-41 (1981)
- (34) Erdmann J, Daehmlow S, Wischke S, Senyuva M, Werner U, Raible J, Tanis N, Dyachenko S, Hummel M, Hetzer R, Regitz-Zagrosek V. Mutation spectrum in a large cohort of unrelated consecutive patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Clin Genet*, 64(4): 339-49 (2003)

- (35) Erdmann J, Hafer A, von Tenspolde W, Binner P, Scheffold T. Vererbung der hypertrophen Kardiomyopathie. Symptomfreie Krankheitsträger molekulargenetisch identifizieren. *Cardio Vasc*, 6(2): 32-5 (2006)
- (36) Erdmann J, Raible J, Maki-Abadi J, Hummel M, Hammann J, Wollnik B, Frantz E, Fleck E, Hetzer R, Regitz-Zagrosek V. Spectrum of clinical phenotypes and gene variants in cardiac myosin-binding protein C mutation carriers with hypertrophic cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol*, 38(2): 322-30 (2001)
- (37) Erdmann J, Shimron-Abarbanell D, Rietschel M, Albus M, Maier W, Körner J, Bondy B, Chen K, Shih JC, Knapp M, Propping P, Nöthen MM. Systematic screening for mutations in the human serotonin-2A (5-HT<sub>2A</sub>) receptor gene: identification of two naturally occurring receptor variants and association analysis in schizophrenia. *Hum Genet*, 97(5): 614-9 (1996)
- (38) Faber L, Meissner A, Ziemssen P, Seggewiss H. Percutaneous transluminal septal myocardial ablation for hypertrophic obstructive cardiomyopathy: long term follow up of the first series of 25 patients. *Heart*, 83(3): 326-31 (2000)
- (39) Fananapazir L, Epstein ND. Prevalence of Hypertrophic Cardiomyopathy and Limitations of Screening Methods. *Circulation*, 92: 700-4 (1995)
- (40) Flachskampf FA: Übersicht über Normwerte. In Flachskampf FA: Kursbuch Echokardiographie. 1. Aufl., Innenseite des Buchdeckels, Thieme Verlag, Stuttgart, 2001
- (41) Flashman E, Redwood C, Moolman-Smook J, Watkins H. Cardiac myosin binding protein C: its role in physiology and disease. *Circ Res*, 94(10): 1279-89 (2004)
- (42) Frazer KA, Tao H, Osoegawa K, de Jong PJ, Chen X, Doherty MF, Cox DR. Noncoding sequences conserved in a limited number of mammals in the SIM2 interval are frequently functional. Frazer KA, Tao H, Osoegawa K, de Jong PJ, Chen X, Doherty MF, Cox DR. *Genome Res*, 14(3): 367-72 (2004)
- (43) Freiburg A, Gautel M. A molecular map of the interactions between titin and myosin-binding protein C. Implications for sarcomeric assembly in familial hypertrophic cardiomyopathy. *Eur J Biochem*, 235(1-2): 317-23 (1996)
- (44) O' Gara PT, Bonow RO, Maron BJ, Damske BA, Van Lingen A, Bacharach SL, Larson SM, Epstein SE. Myocardial perfusion abnormalities in patients with hypertrophic cardiomyopathy: assessment with thallium-201 emission computed tomography. *Circulation*, 76(6): 1214-23 (1987)

- (45) Geier C, Perrot A, Ozcelik C, Binner P, Counsell D, Hoffmann K, Pilz B, Martiniak Y, Gehmlich K, van der Ven PF, Fürst DO, Vornwald A, von Hodenberg E, Nürnberg P, Scheffold T, Dietz R, Osterziel KJ. Mutations in the human muscle LIM protein gene in families with hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation*, 107(10): 1390-5 (2003)
- (46) Geisterfer-Lowrance AA, Kass S, Tanigawa G, Vosberg HP, McKenna W, Seidman CE, Seidman JG. A molecular basis for familial hypertrophic cardiomyopathy: a beta cardiac myosin heavy chain gene missense mutation. *Cell*, 62(5): 999-1006 (1990)
- (47) Cardio Genetics Mutation Database  
<http://genetics.med.harvard.edu/~seidman/cg3/index.html>  
(Tag des Zugriffs: 31. 08. 2007)
- (48) Geospiza FinchTV: <http://www.geospiza.com/finchtv/>  
(Tag des Zugriffs: 20. 03. 2006)
- (49) McGrath MJ, Cottle DL, Nguyen MA, Dyson JM, Coghill ID, Robinson PA, Holdsworth M, Cowling BS, Hardeman EC, Mitchell CA, Brown S. Four and a half LIM protein 1 binds myosin-binding protein C and regulates myosin filament formation and sarcomere assembly. *J Biol Chem*, 281(11): 7666-83 (2006)
- (50) Greaves SC, Roche AH, Neutze JM, Whitlock RM, Veale AM. Inheritance of hypertrophic cardiomyopathy: a cross sectional and M mode echocardiographic study of 50 families. *Br Heart J*, 58(3): 259-66 (1987)
- (51) Gruen M, Gautel M. Mutations in beta-myosin S2 that cause familial hypertrophic cardiomyopathy (FHC) abolish the interaction with the regulatory domain of myosin-binding protein-C. *J Mol Biol*, 286(3): 933-49 (1999)
- (52) Gruen M, Prinz H, Gautel M. cAPK-phosphorylation controls the interaction of the regulatory domain of cardiac myosin binding protein C with myosin-S2 in an on-off fashion. *FEBS Lett*, 453(3): 254-9 (1999)
- (53) Hardison RC. Conserved noncoding sequences are reliable guides to regulatory elements. *Trends Genet*, 16(9): 369-72 (2000)
- (54) Harland M, Mistry S, Bishop DT, Bishop JA. A deep intronic mutation in CDKN2A is associated with disease in a subset of melanoma pedigrees. *Hum Mol Genet*, 10(23): 2679-86 (2001)
- (55) Harris KM, Spirito P, Maron MS, Zenovich AG, Formisano F, Lesser JR, Mackey-Bojack S, Manning WJ, Udelson JE, Maron BJ. Prevalence, clinical profile, and significance of left ventricular remodeling in the end-stage phase of hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation*, 114(3): 216-25 (2006)

- (56) Harris SP, Bartley CR, Hacker TA, McDonald KS, Douglas PS, Greaser ML, Powers PA, Moss RL. Hypertrophic cardiomyopathy in cardiac myosin binding protein-C knockout mice. *Circ Res*, 90(5): 594-601 (2002)
- (57) Hayashi K. PCR-SSCP: a simple and sensitive method for detection of mutations in the genomic DNA. *PCR Methods Appl*, 1(1): 34-8 (1991)
- (58) Hayashi T, Arimura T, Itoh-Satoh M, Ueda K, Hohda S, Inagaki N, Takahashi M, Hori H, Yasunami M, Nishi H, Koga Y, Nakamura H, Matsuzaki M, Choi BY, Bae SW, You CW, Han KH, Park JE, Knöll R, Hoshijima M, Chien KR, Kimura A. Tcap gene mutations in hypertrophic cardiomyopathy and dilated cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol*, 44(11): 2192-201 (2004)
- (59) Heasman J. Morpholino oligos: making sense of antisense? *Dev Biol*, 243(2): 209-14 (2002)
- (60) Hermida-Prieto M, Laredo R, Monserrat L, Castro-Beiras A. Standard mutation nomenclature in hypertrophic cardiomyopathy: an urgent need. *J Am Coll Cardiol*, 46(2): 380-1 (2005)
- (61) Herron TJ, Rostkova E, Kunst G, Chaturvedi R, Gautel M, Kentish JC. Activation of Myocardial Contraction by the N-Terminal Domains of Myosin Binding Protein-C. *Circ Res*, 98: 1290-1298 (2006)
- (62) Highsmith WE Jr, Nataraj AJ, Jin Q, O'Connor JM, El-Nabi SH, Kusukawa N, Garner MM. Use of DNA toolbox for the characterization of mutation scanning methods. II: evaluation of single-strand conformation polymorphism analysis. *Electrophoresis*, 20(6):1195-203 (1999)
- (63) Ho CY, Seidman CE. A Contemporary Approach to Hypertrophic Cardiomyopathy. *Circulation*, 113: 858-62 (2006)
- (64) Hughes JR, Cheng JF, Ventress N, Prabhakar S, Clark K, Anguita E, De Gobbi M, de Jong P, Rubin E, Higgs DR. Annotation of cis-regulatory elements by identification, subclassification, and functional assessment of multispecies conserved sequences. *Proc Natl Acad Sci USA*, 102(28): 9830-5 (2005)
- (65) Jääskeläinen P, Kuusisto J, Miettinen R, Kärkkäinen P, Kärkkäinen S, Heikkinen S, Peltola P, Pihlajamäki J, Vauhkonen I, Laakso M. Mutations in the cardiac myosin-binding protein C gene are the predominant cause of familial hypertrophic cardiomyopathy in eastern Finland. *J Mol Med*, 80(7): 412-22 (2002)
- (66) St John Sutton MG, Lie JT, Anderson KR, O'Brien PC, Frye RL. Histopathological specificity of hypertrophic obstructive cardiomyopathy. Myocardial fibre disarray and myocardial fibrosis. *Br Heart J*, 44(4): 433-43 (1980)

- (67) Kabat JL, Barberan-Soler S, McKenna P, Clawson H, Farrer T, Zahler AM. Intronic alternative splicing regulators identified by comparative genomics in nematodes. *PLoS Comput Biol*, 2(7): 734-47 (2006)
- (68) Kent, W.J. BLAT-The BLAST-Like Alignment Tool. *Genome Res*, 12(4), 656-664 (2002).
- (69) Kilter H, Böhm M. Hypertrophe Kardiomyopathie als Sarkomer-erkrankung. *Monatsschrift Kinderheilkd*, 152: 649-658 (2004)
- (70) Kizilbash AM, Heinle SK, Grayburn PA. Spontaneous variability of left ventricular outflow tract gradient in hypertrophic obstructive cardiomyopathy. *Circulation*, 97(5): 461-6 (1998)
- (71) Klues HG, Schiffers A, Maron BJ. Phenotypic spectrum and patterns of left ventricular hypertrophy in hypertrophic cardiomyopathy: morphologic observations and significance as assessed by two-dimensional echocardiography in 600 patients. *J Am Coll Cardiol*, 26(7): 1699-708 (1995)
- (72) Knight C, Kurbaan AS, Seggewiss H, Henein M, Gunning M, Harrington D, Fassbender D, Gleichmann U, Sigwart U. Nonsurgical septal reduction for hypertrophic obstructive cardiomyopathy: outcome in the first series of patients. *Circulation*, 95(8): 2075-81 (1997)
- (73) Kol G, Lev-Maor G, Ast G. Human-mouse comparative analysis reveals that branch-site plasticity contributes to splicing regulation. *Hum Mol Genet*, 14(11): 1559-68 (2005)
- (74) Konno T, Shimizu M, Ino H, Fujino N, Uchiyama K, Mabuchi T, Sakata K, Kaneda T, Fujita T, Masuta E, Mabuchi H. A novel mutation in the cardiac myosin-binding protein C gene is responsible for hypertrophic cardiomyopathy with severe ventricular hypertrophy and sudden death. *Clin Sci (Lond)*, 110(1): 125-31 (2006)
- (75) Krawczak M, Reiss J, Cooper DN. The mutational spectrum of single base-pair substitutions in mRNA splice junctions of human genes: causes and consequences. *Hum Genet*, 90(1-2): 41-54 (1992)
- (76) Kryukov GV, Schmidt S, Sunyaev S. Small fitness effect of mutations in highly conserved non-coding regions. *Hum Mol Genet*, 14(15): 2221-9 (2005)
- (77) Lebo RV, Grody WW. Variable penetrance and expressivity of the splice altering 5T sequence in the cystic fibrosis gene. *Genet Test*, 11(1): 32-44 (2007)
- (78) Lettice LA, Heaney SJ, Purdie LA, Li L, de Beer P, Oostra BA, Goode D, Elgar G, Hill RE, de Graaff E. A long-range Shh enhancer regulates expression in the developing limb and fin and is associated with preaxial polydactyly. *Hum Mol Genet*, 12(14): 1725-35 (2003)

- (79) Löffler G: DNA und Gentechnik. In Basiswissen Biochemie mit Pathobiochemie, S 354f, 4. Aufl., Springer-Verlag, Berlin, 2001
- (80) Lombardi R, Betocchi S, Losi MA, Tocchetti CG, Aversa M, Miranda M, D'Alessandro G, Cacace A, Ciampi Q, Chiariello M. Myocardial collagen turnover in hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation*, 108(12): 1455-60 (2003)
- (81) Luo MJ, Reed R. Splicing is required for rapid and efficient mRNA export in metazoans. *Proc Natl Acad Sci USA*, 96(26): 14937-42 (1999)
- (82) Maisch B, Portig I: Entzündliche Herzerkrankungen: Kardiomyopathien. In Berdel WE, Böhn M, Classen M, Diehl V, Kochsiek K, Schmiegel W: *Innere Medizin*. 5. Aufl., S. 350, Urban & Fischer, München, 2004
- (83) De Marchi SF, Allemann Y, Seiler C. Relaxation in hypertrophic cardiomyopathy and hypertensive heart disease: relations between hypertrophy and diastolic function. *Heart*, 83(6): 678-84 (2000)
- (84) Maron BJ. Hypertrophic cardiomyopathy: a systematic review. *JAMA*, 287(10): 1308-20 (2002)
- (85) Maron BJ, Casey SA, Hauser RG, Aeppli DM. Clinical course of hypertrophic cardiomyopathy with survival to advanced age. *J Am Coll Cardiol*, 42(5): 882-8 (2003)
- (86) Maron BJ, Dearani JA, Ommen SR, Maron MS, Schaff HV, Gersh BJ, Nishimura RA. The case for surgery in obstructive hypertrophic cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol*, 44(10): 2044-53 (2004)
- (87) Maron BJ, Epstein SE, Roberts WC. Causes of sudden death in competitive athletes. *J Am Coll Cardiol*, 7(1): 204-14 (1986)
- (88) Maron BJ, Epstein SE, Roberts WC. Hypertrophic cardiomyopathy: a common cause of sudden death in the young competitive athlete. *Eur Heart J*, 4: 135-44 (1983)
- (89) Maron BJ, Gardin JM, Flack JM, Gidding SS, Kurosaki TT, Bild DE. Prevalence of Hypertrophic Cardiomyopathy in a General Population of Young Adults. Ekokardiographic Analysis of 4111 Subjects in the CARDIA Study. *Circulation*, 92: 785-789 (1995)
- (90) Maron BJ, McKenna WJ, Danielson GK, Kappenberger LJ, Kuhn HJ, Seidman CE, Shah PM, Spencer WH, Spirito P, Ten Cate FJ, Wigle ED; 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. *European Society of Cardiology Committee for Practice Guidelines. Eur Heart J*. 24(21): 1965-91 (2003)

- (91) Maron BJ, Niimura H, Casey SA, Soper MK, Wright GB, Seidman JG, Seidman CE. Development of left ventricular hypertrophy in adults in hypertrophic cardiomyopathy caused by cardiac myosin-binding protein C gene mutations. *J Am Coll Cardiol*, 38(2): 315-21 (2001)
- (92) Maron BJ, Pelliccia A, Spirito P. Cardiac disease in young trained athletes. Insights into methods for distinguishing athlete's heart from structural heart disease, with particular emphasis on hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation*, 91(5): 1596-601 (1995)
- (93) Maron BJ, Towbin JA, Thiene G, Antzelevitch C, Corrado C, Arnett D, Moss AJ, Seidman CE, Young JB. Contemporary Definitions and Classifications of the Cardiomyopathies. An American Heart Association Scientific Statement From the Council in Clinical Cardiology, Heart Failure and Transplantation Committee; Quality of Care and Outcomes Research and Functional Genomics and Translational Biology Interdisciplinary Working Groups; and Council on Epidemiology and Prevention. *Circulation*, 113: 1807-1816 (2006)
- (94) Maron BJ, Wolfson JK, Epstein SE, Roberts WC. Morphologic evidence for "small vessel disease" in patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Z Kardiol*, 76: 91-100 (1987)
- (95) Mayer K, Ballhausen W, Leistner W, Rott H. Three novel types of splicing aberrations in the tuberous sclerosis TSC2 gene caused by mutations apart from splice consensus sequences. *Biochim Biophys Acta*, 1502(3): 495-507 (2000)
- (96) Mattick JS, Makunin IV. Non-coding RNA. *Hum Mol Genet*, 15: 17-29 (2006)
- (97) Michels M, Hoedemaekers YM, Kofflard MJ, Frohn-Mulder I, Dooijes D, Majoor-Krakauer D, Ten Cate FJ. Familial screening and genetic counseling in hypertrophic cardiomyopathy: the Rotterdam experience. *Neth Heart J*, 15: 184-9 (2007)
- (98) Mitterski B, Krüger R, Wintermeyer P, Epplen JT. PCR/SSCP detects reliably and efficiently DNA sequence variations in large scale screening projects. *Comb Chem High Throughput Screen*, 3(3): 211-8 (2000)
- (99) Mogensen J, Bahl A, Kubo T, Elanko N, Taylor R, McKenna WJ. Comparison of fluorescent SSCP and denaturing HPLC analysis with direct sequencing for mutation screening in hypertrophic cardiomyopathy. *J Med Genet*, 40(5): 1-5 (2003)
- (100) Moolman JA, Reith S, Uhl K, Bailey S, Gautel M, Jeschke B, Fischer C, Ochs J, McKenna WJ, Klues H, Vosberg HP. A newly created splice donor site in exon 25 of the MyBP-C gene is responsible for inherited hypertrophic cardiomyopathy with incomplete disease penetrance. *Circulation*, 101(12): 1396-402 (2000)

- (101) Moolman-Smook JC, Mayosi B, Brink P, Corfield VA. Identification of a new missense mutation in MyBP-C associated with hypertrophic cardiomyopathy. *J Med Genet*, 35(3): 253-4 (1998)
- (102) Morrow AG, Reitz BA, Epstein SE, Henry WL, Conkle DM, Itscoitz SB, Redwood DR. Operative treatment in hypertrophic subaortic stenosis. Techniques, and the results of pre and postoperative assessments in 83 patients. *Circulation*, 52(1): 88-102 (1975)
- (103) Mülhardt C: Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP). In Mülhardt C: *Experimentator: Molekularbiologie/Genomics*. 4. Aufl., S. 179, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 2003.
- (104) Mullis KB. Target amplification for DNA analysis by the polymerase chain reaction, *Ann Biol Clin (Paris)*, 48(8): 579-82 (1990)
- (105) Musat D, Sherrid MV. Echocardiography in the treatment of hypertrophic cardiomyopathy. *Anadolu Kardiyol Derg*, 6: 18-26 (2006)
- (106) Myerburg RJ, Castellanos A. Cardiac arrest and sudden cardiac death. In: Braunwald E: *Heart disease: a text- book of cardiovascular medicine*. New York: WB Saunders Publishing Co, S. 742–79, 1997
- (107) Nagueh SF, Bachinski LL, Meyer D, Hill R, Zoghbi WA, Tam JW, Quiñones MA, Roberts R, Marian AJ. Tissue Doppler imaging consistently detects myocardial abnormalities in patients with hypertrophic cardiomyopathy and provides a novel means for an early diagnosis before and independently of hypertrophy. *Circulation*, 104(2): 128-30 (2001)
- (108) Nanni L, Pieroni M, Chimenti C, Simionati B, Zimbello R, Maseri A, Frustaci A, Lanfranchi G. Hypertrophic cardiomyopathy: two homozygous cases with "typical" hypertrophic cardiomyopathy and three new mutations in cases with progression to dilated cardiomyopathy. *Biochem Biophys Res Commun*, 309(2): 391-8 (2003)
- (109) Newman EA, Muh SJ, Hovhannisyan RH, Warzecha CC, Jones RB, McKeehan WL, Carstens RP. Identification of RNA-binding proteins that regulate FGFR2 splicing through the use of sensitive and specific dual color fluorescence minigene assays. *RNA*, 12(6): 1129-41 (2006)
- (110) Niimura H, Bachinski LL, Sangwatanaroj S, Watkins H, Chudley AE, McKenna W, Kristinsson A, Roberts R, Sole M, Maron BJ, Seidman JG, Seidman CE. Mutations in the gene for cardiac myosin-binding protein C and late-onset familial hypertrophic cardiomyopathy. *N Engl J Med*, 338(18): 1248-57 (1998)
- (111) Oakley CE, Hambly BD, Curmi PM, Brown LJ. Myosin binding protein C: structural abnormalities in familial hypertrophic cardiomyopathy. *Cell Res*, 14(2): 95-110 (2004)

- (112) Offer G, Moos C, Starr R. A new protein of the thick filaments of vertebrate skeletal myofibrils. Extractions, purification and characterization. *J Mol Biol*, 74(4): 653-76 (1973)
- (113) Okagaki T, Weber FE, Fischman DA, Vaughan KT, Mikawa T, Reinach FC. The major myosin-binding domain of skeletal muscle MyBP-C (C protein) resides in the COOH-terminal, immunoglobulin C2 motif. *J Cell Biol*, 123(3): 619-26 (1993)
- (114) Orgel LE, Crick FH. Selfish DNA: the ultimate parasite. *Nature*, 284(5757): 604-7 (1980)
- (115) Ortlepp JR, Vosberg HP, Reith S, Ohme F, Mahon NG, Schröder D, Klues HG, Hanrath P, McKenna WJ. Genetic polymorphisms in the renin-angiotensin-aldosterone system associated with expression of left ventricular hypertrophy in hypertrophic cardiomyopathy: a study of five polymorphic genes in a family with a disease causing mutation in the myosin binding protein C gene. *Heart*, 87(3): 270-5 (2002)
- (116) Osio A, Tan L, Chen SN, Lombardi R, Nagueh SF, Shete S, Roberts R, Willerson JT, Marian AJ. Myozenin 2 is a novel gene for human hypertrophic cardiomyopathy. *Circ Res*, 100(6): 766-8 (2007)
- (117) Peiper U. Muskulatur: Grundmechanismen der Kontraktion. In Klinke R und Silbernagel S: *Lehrbuch der Physiologie*. S. 85ff, 3. Aufl., Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 2000
- (118) Pelliccia A, Maron BJ, Spataro A, Proschan MA, Spirito P. The upper limit of physiologic cardiac hypertrophy in highly trained elite athletes. *N Engl J Med*, 324(5): 295-301 (1991)
- (119) Perkins MJ, Van Driest SL, Ellsworth EG, Will ML, Gersh BJ, Ommen SR, Ackerman MJ. Gene-specific modifying effects of pro-LVH polymorphisms involving the renin-angiotensin-aldosterone system among 389 unrelated patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Eur Heart J*, 26(22): 2457-62 (2005)
- (120) Petrone RK, Klues HG, Panza JA, Peterson EE, Maron BJ. Coexistence of mitral valve prolapse in a consecutive group of 528 patients with hypertrophic cardiomyopathy assessed with echocardiography. *J Am Coll Cardiol*, 20(1): 55-61 (1992)
- (121) Phadke RS, Vaideeswar P, Mittal B, Deshpande J. Hypertrophic Cardiomyopathy: An Autopsy Analysis of 14 cases. *Journal of postgraduate Medicine*, 47: 165-170 (2001)
- (122) Prabhakar S, Poulin F, Shoukry M, Afzal V, Rubin EM, Couronne O, Pennacchio LA. Close sequence comparisons are sufficient to identify human cis-regulatory elements. *Genome Res*, 16(7): 855-63. (2006)

- (123) Primer 3 Input: <http://frodo.wi.mit.edu/>  
(mehrfacher Zugriff: zuletzt im März 2006)
- (124) Priori SG, Aliot E, Blømstrom-Lundqvist C, Bossaert L, Breithardt G, Brugada P, Camm JA, Cappato R, Cobbe SM, Di MC, Maron BJ, McKenna WJ, Pedersen AK, Ravens U, Schwartz PJ, Trusz-Gluza M, Vardas P, Wellens HJ, Zipes DP. Task Force on Sudden Cardiac Death, European Society of Cardiology. *Europace*, 4(1): 3-18 (2002)
- (125) Richard P, Charron P, Carrier L, Ledeuil C, Cheav T, Pichereau C, Benaiche A, Isnard R, Dubourg O, Burbanc M, Gueffet JP, Millaire A, Desnos M, Schwartz K, Hainque B, Komajda M. Hypertrophic cardiomyopathy: distribution of disease genes, spectrum of mutations, and implications for a molecular diagnosis strategy. EUROGENE Heart Failure Project. *Circulation*, 107(17): 2227-32 (2003)
- (126) Richard P, Isnard R, Carrier L, Dubourg O, Donatien Y, Mathieu B, Bonne G, Gary F, Charron P, Hagege M, Komajda M, Schwartz K, Hainque B. Double heterozygosity for mutations in the beta-myosin heavy chain and in the cardiac myosin binding protein C genes in a family with hypertrophic cardiomyopathy. *J Med Genet*, 36(7): 542-5 (1999)
- (127) Richardson P, McKenna W, Bristow M, Maisch B, Mautner B, O'Connell J, Olsen E, Thiene G, Goodwin J, Gyarsfas I, Martin I, Nordet P. Report of the 1995 World Health Organization/International Society and Federation of Cardiology Task Force on the Definition and Classification of cardiomyopathies. *Circulation*, 93(5): 841-2 (1996)
- (128) Rickers C, Wilke NM, Jerosch-Herold M, Casey SA, Panse P, Panse N, Weil J, Zenovich AG, Maron BJ. Utility of cardiac magnetic resonance imaging in the diagnosis of hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation*, 112(6): 855-61 (2005)
- (129) Roberts R, Sigwart U. New Concepts in Hypertrophic Cardiomyopathies, Part I. *Circulation*, 104(18): 2249-52 (2001)
- (130) Rottbauer W, Gautel M, Zehelein J, Labeit S, Franz WM, Fischer C, Vollrath B, Mall G, Dietz R, Kübler W, Katus HA. Novel splice donor site mutation in the cardiac myosin-binding protein-C gene in familial hypertrophic cardiomyopathy. Characterization Of cardiac transcript and protein. *J Clin Invest*, 100(2): 475-82 (1997)
- (131) Sarikas A, Carrier L, Schenke C, Doll D, Flavigny J, Lindenberg KS, Eschenhagen T, Zolk O. Impairment of the ubiquitin-proteasome system by truncated cardiac myosin binding protein C mutants. *Cardiovasc Res*, 66(1): 33-44 (2005)
- (132) Seidman JG, Seidman C. The genetic basis for cardiomyopathy: from mutation identification to mechanistic paradigms. *Cell*, 104(4): 557-67 (2001)

- (133) Seyffer W: Genexpression: Von der Information zum Produkt: Die Prozessierung eukaryotischer mRNA. In Seyffert W: Lehrbuch der Genetik, S. 66f, 2. Aufl., Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 2003.
- (134) Shapiro MB, Senapathy P. RNA splice junctions of different classes of eukaryotes: sequence statistics and functional implications in gene expression. *Nucleic Acids Res*, 15(17): 7155-74 (1987)
- (135) Sheffield VC, Beck JS, Kwitek AE, Sandstrom DW, Stone EM. The sensitivity of single-strand conformation polymorphism analysis for the detection of single base substitutions. *Genomics*, 16(2): 325-32 (1993)
- (136) Shirani J, Maron BJ, Cannon RO 3rd, Shahin S, Roberts WC. Clinicopathologic features of hypertrophic cardiomyopathy managed by cardiac transplantation. *Am J Cardiol*, 72(5): 434-40 (1993)
- (137) Siepel A, Bejerano G, Pedersen JS, Hinrichs AS, Hou M, Rosenbloom K, Clawson H, Spieth J, Hillier LW, Richards S, Weinstock GM, Wilson RK, Gibbs RA, Kent WJ, Miller W, Haussler D. Evolutionarily conserved elements in vertebrate, insect, worm, and yeast genomes. *Genome Res*, 15(8): 1034-50 (2005)
- (138) Sironi M, Menozzi G, Comi GP, Cagliani R, Bresolin N, Pozzoli U. Analysis of intronic conserved elements indicates that functional complexity might represent a major source of negative selection on non-coding sequences. *Hum Mol Genet*, 14(17): 2533-46 (2005)
- (139) Spirito P, Autore C. Management of hypertrophic cardiomyopathy. *BMJ*, 332(7552): 1251-5 (2006)
- (140) Spirito P, Seidman CE, McKenna WJ, Maron BJ. The management of hypertrophic cardiomyopathy. *N Engl J Med*, 336(11): 775-85 (1997)
- (141) Starr R, Offer G. Polypeptide chains of intermediate molecular weight in myosin preparations. *FEBS Lett*, 15(1): 40-44 (1971)
- (142) Strachan T, Reed AP: DNA-Struktur und Genexpression: Für die eukaryotische Genexpression sind *cis*-aktive regulatorische Elemente und *trans*-aktive Transkriptionsfaktoren erforderlich. In Strachan T, Reed AP: Molekulare Humangenetik. Übersetzung Seidler L, S. 19f, 3. Aufl., Elsevier Spektrum Akademischer Verlag, München 2005.
- (143) Strachan T, Read AP: DNA-Struktur und Genexpression: RNA-Prozessierung. In Strachan T, Read AP: Molekulare Humangenetik. Übersetzung Seidler L, S. 22f, 3. Aufl., Elsevier Spektrum Akademischer Verlag, München, 2005.

- (144) Strachan T, Read AP: Die Instabilität des menschlichen Genoms: Mutationen und DNA-Reparatur: Pathogene Mutationen. In Strachan T, Read AP: Molekulare Humangenetik. Übersetzung Seidler L, S. 387-390, 3. Aufl., Elsevier Spektrum Akademischer Verlag, München, 2005.
- (145) Strachan T, Read AP: Molekulare Humangenetik. Mutationen, Polymorphismus und DNA-Reparatur: ein Überblick. In Strachan T, Read AP: Molekulare Humangenetik. Übersetzung Seidler L, S. 366, 3. Aufl., Elsevier Spektrum Akademischer Verlag, München, 2005.
- (146) Strachan T, Read AP: Organisation, Verteilung und Funktion der proteincodierenden Gene des Menschen. In Strachan T, Read AP: Molekulare Humangenetik. Übersetzung Seidler L, S. 296, 3. Aufl., Elsevier Spektrum Akademischer Verlag, München, 2005.
- (147) Suen TC, Goss PE. Identification of a novel transcriptional repressor element located in the first intron of the human BRCA1 gene. *Oncogene*, 20(4): 440-50 (2001)
- (148) Tardiff JC. Sarcomeric proteins and familial hypertrophic cardiomyopathy: linking mutations in structural proteins to complex cardiovascular phenotypes. *Heart Fail Rev*, 10(3): 237-48 (2005)
- (149) Teraoka SN, Telatar M, Becker-Catania S, Liang T, Onengüt S, Tolun A, Chessa L, Sanal O, Bernatowska E, Gatti RA, Concannon P. Splicing defects in the ataxia-telangiectasia gene, ATM: underlying mutations and consequences. *Am J Hum Genet*, 64(6): 1617-31 (1999)
- (150) Thiene G, Corrado D, Basso C. Cardiomyopathies: is it time for a molecular classification? *Eur Heart J*, 25(20): 1772-5 (2004)
- (151) de Tombe PP. Myosin binding protein C in the heart. *Circ Res*, 98(10): 1234-6 (2006)
- (152) UCSC Genome: <http://genome.ucsc.edu/>  
(mehrfacher Zugriff: zuletzt im August 2007)
- (153) The Universal Protein Knowledgebase:  
<http://www.ebi.uniprot.org/entry/Q14896>  
(Tag des Zugriffs: 10. 09. 2007)

(154) Venter JC, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ, Sutton GG, Smith HO, Yandell M, Evans CA, Holt RA, Gocayne JD, Amanatides P, Ballew RM, Huson DH, Wortman JR, Zhang Q, Kodira CD, Zheng XH, Chen L, Skupski M, Subramanian G, Thomas PD, Zhang J, Gabor Miklos GL, Nelson C, Broder S, Clark AG, Nadeau J, McKusick VA, Zinder N, Levine AJ, Roberts RJ, Simon M, Slayman C, Hunkapiller M, Bolanos R, Delcher A, Dew I, Fasulo D, Flanigan M, Florea L, Halpern A, Hannenhalli S, Kravitz S, Levy S, Mobarry C, Reinert K, Remington K, Abu-Threideh J, Beasley E, Biddick K, Bonazzi V, Brandon R, Cargill M, Chandramouliswaran I, Charlab R, Chaturvedi K, Deng Z, Di Francesco V, Dunn P, Eilbeck K, Evangelista C, Gabrielian AE, Gan W, Ge W, Gong F, Gu Z, Guan P, Heiman TJ, Higgins ME, Ji RR, Ke Z, Ketchum KA, Lai Z, Lei Y, Li Z, Li J, Liang Y, Lin X, Lu F, Merkulov GV, Milshina N, Moore HM, Naik AK, Narayan VA, Neelam B, Nusskern D, Rusch DB, Salzberg S, Shao W, Shue B, Sun J, Wang Z, Wang A, Wang X, Wang J, Wei M, Wides R, Xiao C, Yan C, Yao A, Ye J, Zhan M, Zhang W, Zhang H, Zhao Q, Zheng L, Zhong F, Zhong W, Zhu S, Zhao S, Gilbert D, Baumhueter S, Spier G, Carter C, Cravchik A, Woodage T, Ali F, An H, Awe A, Baldwin D, Baden H, Barnstead M, Barrow I, Beeson K, Busam D, Carver A, Center A, Cheng ML, Curry L, Danaher S, Davenport L, Desilets R, Dietz S, Dodson K, Doup L, Ferreira S, Garg N, Gluecksmann A, Hart B, Haynes J, Haynes C, Heiner C, Hladun S, Hostin D, Houck J, Howland T, Ibegwam C, Johnson J, Kalush F, Kline L, Koduru S, Love A, Mann F, May D, McCawley S, McIntosh T, McMullen I, Moy M, Moy L, Murphy B, Nelson K, Pfannkoch C, Pratts E, Puri V, Qureshi H, Reardon M, Rodriguez R, Rogers YH, Romblad D, Ruhfel B, Scott R, Sitter C, Smallwood M, Stewart E, Strong R, Suh E, Thomas R, Tint NN, Tse S, Vech C, Wang G, Wetter J, Williams S, Williams M, Windsor S, Winn-Deen E, Wolfe K, Zaveri J, Zaveri K, Abril JF, Guigó R, Campbell MJ, Sjolander KV, Karlak B, Kejariwal A, Mi H, Lazareva B, Hatton T, Narechania A, Diemer K, Muruganujan A, Guo N, Sato S, Bafna V, Istrail S, Lippert R, Schwartz R, Walenz B, Yooseph S, Allen D, Basu A, Baxendale J, Blick L, Caminha M, Carnes-Stine J, Caulk P, Chiang YH, Coyne M, Dahlke C, Mays A, Dombroski M, Donnelly M, Ely D, Esparham S, Fosler C, Gire H, Glanowski S, Glasser K, Glodek A, Gorokhov M, Graham K, Gropman B, Harris M, Heil J, Henderson S, Hoover J, Jennings D, Jordan C, Jordan J, Kasha J, Kagan L, Kraft C, Levitsky A, Lewis M, Liu X, Lopez J, Ma D, Majoros W, McDaniel J, Murphy S, Newman M, Nguyen T, Nguyen N, Nodell M, Pan S, Peck J, Peterson M, Rowe W, Sanders R, Scott J, Simpson M, Smith T, Sprague A, Stockwell T, Turner R, Venter E, Wang M, Wen M, Wu D, Wu M, Xia A, Zandieh A, Zhu X. The sequence of the human genome. *Science*, 291(5507): 1304-51 (2001)

(155) Wang P, Zou Y, Fu C, Zhou X, Hui R. MYBPC3 polymorphism is a modifier for expression of cardiac hypertrophy in patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Biochem Biophys Res Commun*, 329(2): 796-9 (2005)

(156) Watkins H, Conner D, Thierfelder L, Jarcho JA, MacRae C, McKenna WJ, Maron BJ, Seidman JG, Seidman CE. Mutations in the cardiac myosin binding protein-C gene on chromosome 11 cause familial hypertrophic cardiomyopathy. *Nat Genet*, 11(4): 434-7 (1995)

- 
- (157) Wigle ED. Cardiomyopathy. The diagnosis of hypertrophic cardiomyopathy. *Heart*, 86: 709-714 (2001)
- (158) Wigle ED, Rakowski H, Kimball BP, Williams WG. Hypertrophic cardiomyopathy. Clinical spectrum and treatment. *Circulation*, 92(7): 1680-92 (1995)
- (159) Wigle ED, Sasson Z, Henderson MA, Ruddy TD, Fulop J, Rakowski H, Williams WG. Hypertrophic cardiomyopathy. The importance of the site and the extent of hypertrophy. A review. *Prog Cardiovasc Dis*, 28(1): 1-83 (1985)
- (160) Woolfe A, Goodson M, Goode DK, Snell P, McEwen GK, Vavouri T, Smith SF, North P, Callaway H, Kelly K, Walter K, Abnizova I, Gilks W, Edwards YJ, Cooke JE, Elgar G. Highly conserved non-coding sequences are associated with vertebrate development. *PLoS Biol*, 3(1): 116-30 (2005)
- (161) Wray GA, Hahn MW, Abouheif E, Balhoff JP, Pizer M, Rockman MV, Romano LA. The evolution of transcriptional regulation in eukaryotes. *Mol Biol Evol*, 20(9): 1377-419 (2003)
- (162) Yang Q, Sanbe A, Osinska H, Hewett TE, Klevitsky R, Robbins J. A mouse model of myosin binding protein C human familial hypertrophic cardiomyopathy. *J Clin Invest*, 102(7): 1292-300 (1998)

## 5.2 Erklärung über Zustimmung der Ethikkommission

UNIVERSITÄTSKLINIKUM  
Schleswig-Holstein  
**Campus Lübeck**  
Medizinische Klinik II  
Direktor: Prof. Dr. med. Heribert Schunkert  
**Ansprechpartner:** PD Dr. rer. nat. Jeanette Erdmann  
**Tel:** 0451 / 500-4857  
**Fax:** 0451 / 500-6437  
**E-Mail:** j.erdmann@cardiogenics.eu  
**Internet:** www.uk-s-h.de

Datum: 21. 02. 2008

Hiermit bestätige ich, dass die experimentellen Arbeiten für die vorliegende Dissertation mit dem Thema

“Bedeutung von intronischen Sequenzvarianten im Gen des Myosinbindungsproteins C3 für den Phänotyp einer Hypertrophen Kardiomyopathie”

von der Ethikkommission der Charité, Campus Virchow Klinik, Humboldt Universität Berlin genehmigt waren.

Aktenzeichen: 72/2002

Datum der Genehmigungsschreibens: 16. April 2002



### **5.3 Danksagung**

Für die Unterstützung, die ich beim Anfertigen dieser Arbeit erhalten habe, möchte ich mich herzlich bedanken. Ohne diese Hilfe wäre die Arbeit so nicht zustande gekommen.

An erster Stelle möchte mich bei Privat-Dozentin Dr. rer. nat. Jeanette Erdmann dafür bedanken, dass sie mir das Thema der Arbeit überlassen hat und mich in ihrer molekulargenetischen Abteilung hat experimentieren lassen. Während meiner Tätigkeit im Labor, später bei der Auswertung der Daten sowie beim Erstellen der Dissertation stand sie mir jederzeit hilfreich beiseite. Sie zeigte Interesse an meiner Tätigkeit und förderte durch nützliche Anregungen den Fortschritt der Arbeiten.

Mein Dank gilt auch Herrn Dr. Björn Mayer, der auf der Suche nach einer geeigneten Dissertation den Kontakt zu Frau Dr. Erdmann hergestellt hatte.

Ferner möchte ich mich bei allen Mitarbeitern aus dem molekulargenetischen Labor bedanken. Die Arbeit mit ihnen habe ich als äußerst angenehm und sehr freundlich empfunden, so dass ich mich willkommen und akzeptiert fühlte. Alle haben mir sehr geholfen. Im Einzelnen geht mein Dank daher an Dr. Zouhair Aberrahrou, Petra Bruse, Anika Götz, Dr. Andrea Hafer, Dr. Wolfgang Lieb, Dr. Henrike Liptau, Dr. Andrea Pomarino und Annett Thiemig, sowie die beiden Doktoranden Iris Borwitzky und Hajrullah Ahmeti, die zeitgleich mit mir im Labor tätig waren. Ganz besonderer Dank gilt Sandra Wrobel, die mir während der Arbeit im Labor besonders geduldig mit Rat und Tat zur Seite stand.

Frau Prof. Dr. Regitz-Zagrosek aus dem Center for Cardiovascular Research in Berlin danke ich für das Überlassen der DNA-Proben der HCM-Patienten. Frau Borzym aus dem Institut für molekulare Genetik in Berlin danke ich für ihre Hilfe beim Auswerten der Sequenzen.

Abschließend gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. Schunkert für das Bereitstellen des Arbeitsplatzes in seiner Klinik und das Überlassen der verwendeten Materialien.

#### **5.4 Lebenslauf**

Aus Gründen des Datenschutzes ist der Lebenslauf in diesem Dokument nicht enthalten.

