

Aus der Klinik für Innere Medizin - Schwerpunkt Kardiologie  
(Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. Bernhard Maisch)  
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

in Zusammenarbeit mit dem Universitätsklinikum  
Gießen und Marburg GmbH, Standort Marburg

# Mutationsanalyse des ANKRD1-Gens bei Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie



Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin

dem Fachbereich Medizin  
der Philipps-Universität Marburg  
vorgelegt von

Sarah Ackermann aus Helmstedt  
Marburg, 2011

Angenommen vom Fachbereich Medizin  
der Philipps-Universität Marburg am 08. März 2012

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan:	Univ.-Prof. Dr. med. Matthias Rothmund
Referent:	Prof. Dr. mult. Thomas Meyer
1. Korreferent:	Prof. Dr. Alexander Brehm

# Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	III
Tabellenverzeichnis	IV
<b>1</b> Abkürzungen und Fachbegriffe	<b>1</b>
<b>2</b> Einleitung	<b>4</b>
2.1 Pathophysiologie der dilatativen Kardiomyopathie	4
2.2 Genetische Grundlagen der dilatativen Kardiomyopathie	10
2.3 Zielsetzung der Arbeit	18
<b>3</b> Material	<b>20</b>
3.1 Geräte	20
3.2 Chemikalien	21
3.3 Sonstige Materialien	22
3.4 Puffer	22
3.5 Primer	22
3.6 Untersuchungsmaterial	23
<b>4</b> Methoden	<b>25</b>
4.1 Polymerase-Kettenreaktion	25
4.2 DNA-Gelelektrophorese	27
4.3 Einzelstrang-Konformations-Polymorphismus-Analyse (SSCP)	28
4.4 Reinigung von PCR-Produkten für die Sequenzierung	30
4.5 DNA-Sequenzierung	30
<b>5</b> Ergebnisse	<b>32</b>
5.1 Patientenkollektiv	32
5.2 Durchführung des Mutationsscreenings	33
5.3 Nachweis einer stillen Mutation im Exon 2	35
5.4 Detektion eines unbekanntem Polymorphismus im Exon 1	37
5.5 Identifizierung bekannter Polymorphismen im Exon 3/4	39

5.6	Identifikation eines Polymorphismus im Intron 7	41
5.7	Nachweis eines Polymorphismus im Intron 9	42
5.8	Fehlende Variationen in den Exons des ANKRD1-Gens	43
5.9	Zusammenfassung der Ergebnisse	43
<b>6</b>	<b>Diskussion</b>	<b>45</b>
6.1	Identifizierung von Mutationen im ANKRD1-Gen bei Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie	45
6.2	ANKRD1 als Kandidatengen	47
6.3	Limitationen der vorliegenden Arbeit	54
6.4	Ausblick	55
<b>7</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>57</b>
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>61</b>
<b>9</b>	<b>Verzeichnis akademischer Lehrer</b>	<b>70</b>
	<b>Danksagung</b>	<b>72</b>

# Abbildungsverzeichnis

- Abb. 2.1: Ätiologische Klassifikation der Kardiomyopathien der ESC-Working-Group.
- Abb. 2.2: Struktur des ANKRD1-Gens sowie des kardialen Ankyrin-Repeat-Proteins.
- Abb. 4.3: Schematischer Überblick über die Technik der SSCP-Analyse.
- Abb. 5.1.1: Darstellung aller PCR-Amplifikate, die für die neun Exons im Gen des kardialen Ankyrin-Repeat-Proteins kodieren.
- Abb. 5.1.2: Gelelektrophoretische Auftrennung von jeweils 8 Proben der Exone 1, 2, 3/4 und 5 mittels SSCP-Analyse.
- Abb. 5.1.3: Gelelektrophoretische Auftrennung von jeweils 8 Proben der Exons 6, 7, 8 und 9 mittels SSCP-Analyse.
- Abb. 5.3.1: Ausschnitt einer SSCP-Analyse von Exon 2 des ANKRD1-Gens.
- Abb. 5.3.2: Sequenzausschnitt des Chromatogramms von Exon 2 des ANKRD1-Gens.
- Abb. 5.4.1: SSCP-Analyse von Exon 1 des ANKRD1-Gens bei DCM-Patienten.
- Abb. 5.4.2: SSCP-Analyse des Exon 1 des ANKRD1-Gens von Kontrollen.
- Abb. 5.4.3: Rückwärtssequenzierung von Exon 1 des ANKRD1-Gens mit Nachweis einer heterozygoten C>T-Transition in Nukleotid-Position 170.
- Abb. 5.5.1: SSCP-Analyse von Exon 3/4 des ANKRD1-Gens.
- Abb. 5.5.2: Ergebnis der Sequenzierung von Exon 3/4 des ANKRD1-Gens.
- Abb. 5.6.1: SSCP-Analyse von Exon 7 des ANKRD1-Gens.
- Abb. 5.6.2: Sequenzierergebnis von Exon 7 des ANKRD1-Gens.
- Abb. 5.7.1: SSCP-Analyse von Exon 9 des ANKRD1-Gens.
- Abb. 5.7.2: Sequenzausschnitt des Chromatogramms von Exon 9 des ANKRD1-Gens.
- Abb. 5.9: Darstellung der Ergebnisse in der Genstruktur des ANKRD1-Gens.
- Abb. 6.2: Darstellung der vorbekannten und eigenen Ergebnisse der Mutationsanalysen für das ANKRD1-Gen.

# Tabellenverzeichnis

- Tab. 1.1: Proteinogene Aminosäuren und ihr 1-Buchstabencode.
- Tab. 2.1.1: Ursachen der dilatativen Kardiomyopathie (Felker et al., 2000).
- Tab. 2.1.2: Hämodynamische Stadieneinteilung der DCM.
- Tab. 2.2: Übersicht der chromosomalen Loci und krankheitsassoziierten Gene bei dilatativer Kardiomyopathie als dominierenden Phänotyp.
- Tab. 3.1: Verwendete Geräte und ihre Hersteller.
- Tab. 3.2: Verwendete Chemikalien und ihre Hersteller.
- Tab. 3.5: Zusammenstellung der in dieser Arbeit verwendeten Primer.
- Tab. 4.1: Temperaturprogramm der Touch-down-PCR.
- Tab. 5.1: Klinische Daten des untersuchten Patientenkollektivs.
- Tab. 5.2: Elektrophoresebedingungen aller neun Exons des ANKRD1-Gens.
- Tab. 5.9: Zusammenfassung der Ergebnisse.

# 1 Abkürzungen und Fachbegriffe

°C	Grad Celsius
μ	mikro
ACTC	alpha-Aktin-Gen
AD	autosomal dominant
AHA	American Heart Association
ANK	Ankyrin-Repeat
ANKRD1-Gen	Ankyrin-Repeat-Domain-1-Gen
ANKRD2-Gen	Ankyrin-Repeat-Domain-2-Gen
ANP	atriales natriuretisches Peptid
AP	Angina pectoris
APS	Ammoniumpersulfat
AR	autosomal rezessiv
bp	Basenpaare
CARP	Cardiac-Ankyrin-Repeat-Protein
CASP3	Caspase 3
CASQ2	Calsequestrin 2
CC	Coiled-Coil-Domäne
cDNA	komplementäre DNA
cTnC	kardiales Troponin-C
d	Tag(e)
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
DCM	dilatative Kardiomyopathie
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
ddNTP	Didesoxynukleosidtriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynucleosidtriphosphat
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EF	Ejektionsfraktion
EKG	Elektrokardiogramm

EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
FCM	familiäre dilatative Kardiomyopathie
g	Gramm
h	Stunde(n)
Hf	Herzfrequenz
H <sub>2</sub> O	Wasser
HMV	Herzminutenvolumen
ICD	Implantierbarer Kardioverter-Defibrillator
INR	International Normalized Ratio
IL-1 $\alpha$	Interleukin-1 $\alpha$
ISFC	International Society and Federation of Cardiology Task Force
k	Kilo
KHK	koronare Herzerkrankung
l	Liter
Lj	Lebensjahr
LVEDD	Linksventrikulärer enddiastolischer Durchmesser
m	milli, meter
M	molar
MARP	Muscle-Ankyrin-Repeat-Protein
Min.	Minute(n)
MLP	Muskel-LIM-Protein
mRNA	Boten-RNA
n	nano
NaOH	Natriumhydroxid
NES	Nukleäres-Export-Signal
NLS	Nukleäres-Lokalisations-Signal
NYHA	New York Heart Association
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEST	Prolin/Tyrosin/Serin/Threonin-reiche Sequenz
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System

RNA	Ribonukleinsäure
Sek.	Sekunde(n)
TBE	Tris-Borsäure-EDTA
TBS	Titin-Bindestelle
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor-alpha
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
Tm	Schmelztemperatur von Primern
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
V	Volt
VF	Verkürzungsfraction
WHO	World Health Organisation
WT	Wildtyp
X	X-chromosomal
YB-1	Y-Box Transkriptionsfaktor 1
5-JÜR	5-Jahresüberlebensrate

## Proteinogene Aminosäuren: Abkürzungen

Tab. 1.1: Proteinogene Aminosäuren und ihr 1-Buchstabencode.

Aminosäure	1-Buchstabencode	Aminosäure	1-Buchstabencode
Alanin	A	Methionin	M
Cystein	C	Asparagin	N
Aspartat	D	Prolin	P
Glutamat	E	Glutamin	Q
Phenylalanin	F	Arginin	R
Glycin	G	Serin	S
Histidin	H	Threonin	T
Isoleucin	I	Valin	V
Lysin	K	Tryptophan	W
Leucin	L	Tyrosin	Y

## 2 Einleitung

### 2.1 Pathophysiologie der dilatativen Kardiomyopathie

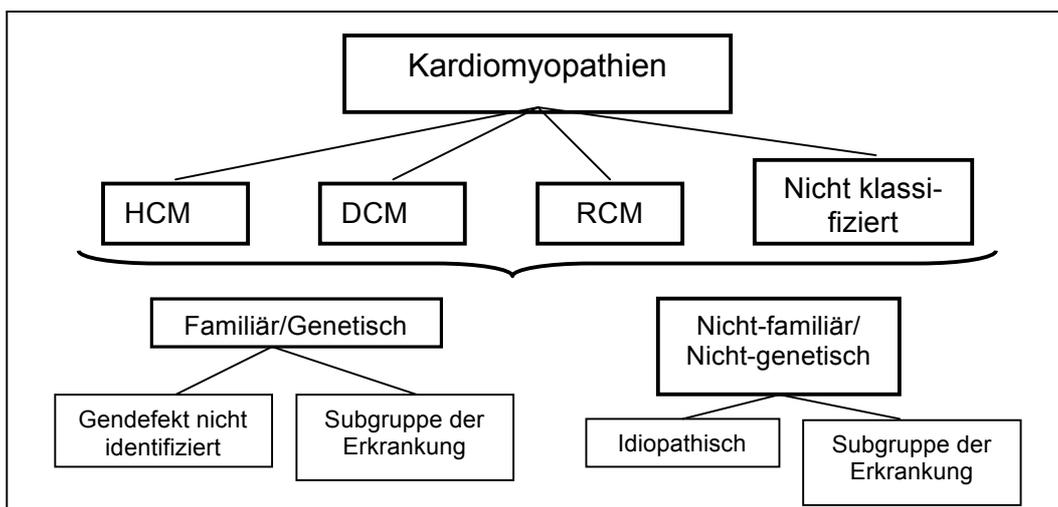
Dilatative Kardiomyopathien sind Erkrankungen des Herzmuskels, die mit einer mechanischen oder elektrophysiologischen Funktionsstörung des Herzens einhergehen. Sie sind per definitionem genuine Erkrankungen des Myokards, die demnach keine Folge eines Bluthochdrucks, angeborener Herzfehler, Herzklappenerkrankungen oder einer reinen Perikarditis ohne myoepikardiale, entzündliche Beteiligung sind (Pankuweit et al., 2009).

Der Begriff der Kardiomyopathie kam erstmals im Jahr 1957 auf und bezeichnete zu dieser Zeit seltene, nicht-koronare Erkrankungen des Myokards unklarer Ätiologie (Bridgen, 1957). Bis 1980 existierten verschiedene Definitionen für die Kardiomyopathie, die dann von der World Health Organisation (WHO) und der International Society and Federation of Cardiology Task Force (ISFC) einheitlich als primäre Herzmuskelerkrankung unbekannter Ursache klassifiziert wurde (Report of the WHO/ISFC Task Force, 1980). Die erste Klassifikation spiegelte einen generellen Mangel an Informationen über die Herzmuskelerkrankungen wider und wurde 1996, unter stärkerer Berücksichtigung von Ätiologie und Pathophysiologie, durch die WHO und ISFC erweitert (Richardson et al., 1996). In dieser Klassifikation wurden die Kardiomyopathien nun als „Herzmuskelerkrankungen mit kardialer Dysfunktion“ definiert. Seitdem werden fünf Formen von Kardiomyopathien auf der Grundlage von morphologisch und echokardiographisch erfassbaren Veränderungen des Herzmuskels unterschieden: dilatative Kardiomyopathie, hypertrophe Kardiomyopathie, restriktive Kardiomyopathie, arrhythmogene rechtsventrikuläre Kardiomyopathie und nicht klassifizierbare Kardiomyopathien. Des Weiteren wurde die Gruppe der „spezifischen Kardiomyopathien“ eingeführt, denen spezielle kardiale Erkrankungen oder Systemerkrankungen als auslösende Ursachen zugrunde liegen.

Im Jahr 2006 stellte die American Heart Association (AHA) eine weitere Definition auf und veröffentlichte zudem eine neue Klassifizierung. Als Grundlage für diese Einteilung in primäre, vorzugsweise das Herz betreffende und sekundäre Kardiomyopathien, Erkrankungen, die zu einer Herzmuskelbeteili-

gung führen können, diente im Wesentlichen der Genotyp. Dieser Ansatz wurde von der Europäischen Gesellschaft für Kardiologie (ESC) als obsolet, wie auch als zu wenig klinisch orientiert kritisiert. Daraufhin stellte die ESC ihre neue und derzeit aktuelle Einteilung der Kardiomyopathien vor. Diese orientiert sich an dem Klassifikationssystem der WHO und ISFC von 1996. Die Gruppierung nach der Morphologie und dem funktionellen Phänotyp bleibt bestehen. Zudem wird jeder Phänotyp in eine familiäre/genetische bzw. nichtfamiliäre Form subklassifiziert (**Abb. 2.1**). Diese klinisch orientierte Einteilung ist nach Meinung der ESC zur Diagnose und Behandlung von Patienten und ihren Familien mit Herzmuskelerkrankungen von klinischem Nutzen. Zudem soll sie den Kliniker motivieren, im Falle einer familiären DCM spezielle Diagnostik, wie zum Beispiel genetische Untersuchungen, anzuwenden (Elliot et al., 2008). Eine einheitlich, allgemein anerkannte Klassifikation steht somit, auch nach vielen Modifikationen des Klassifikationssystems, bislang nicht zur Verfügung.

**Abb. 2.1.: Ätiologische Klassifikation der Kardiomyopathien der ESC Working Group.**



Die dilatative Kardiomyopathie ist durch eine ventrikuläre Dilatation sowie eine systolische, kontraktile Dysfunktion einer oder beider Ventrikel charakterisiert. Intensive Forschungen zu den Ursachen und Mechanismen der Krankheitsentstehung lassen eine multifaktorielle Genese vermuten. Felker und Mitarbeitern gelang es 2000, mit ihrer Studie bei der Hälfte der Studienteilnehmer die zugrunde liegende Ursache für die Entstehung der DCM aufzudecken (**Tab. 2.1.1**). In der anderen Hälfte der Fälle blieb die Ätiologie hingegen unbekannt (idiopathische DCM). Des Weiteren bestätigte die Arbeitsgruppe schon frühere Vermutungen einer Korrelation zwischen der Ursache der Erkrankung und der Überlebenszeit. Patienten, die an der selten vorkommenden peripartalen Kardiomyopathie erkrankt sind, lebten mit einer 5-Jahresüberlebensrate (5-JÜR) von 94% signifikant länger als solche mit einer idiopathischen DCM (5-JÜR 77%). Die schlechteste Prognose weisen Patienten mit Herzmuskelerkrankungen auf, die durch eine HIV-Infektion (5-JÜR 23%) oder einer Erkrankung an Amyloidose (5-JÜR 24%) oder Hämochromatose (5-JÜR 23%) bedingt sind. Generell gilt: männliches Geschlecht und ein höheres Lebensalter gehen mit einer schlechteren Prognose einher als weibliches Geschlecht und jüngeres Alter.

**Tab. 2.1.1: Ursachen der dilatativen Kardiomyopathie (Felker et al., 2000)**

Ursache	Anteil (in %)
Idiopathische DCM	50
Myokarditis	9
Ischämische Herzerkrankung	7
Infiltrative Herzerkrankung (Amyloidose, Sarkoidose, Hämochromatose)	5
Peripartale Kardiomyopathie	4
Hypertension	4
HIV-Infektion	4
Bindegewebserkrankung	3
Substanzmissbrauch	3
Doxorubicin-Therapie	1
Andere	10

In größeren epidemiologischen Studien wurde die Gruppe der idiopathischen DCM weiter untersucht. Es konnte belegt werden, dass bis zu 50% der als idiopathisch klassifizierten Fälle eine familiäre Häufung zugrunde liegt (Grünig et al., 1998). Des Weiteren konnten in einer Vielzahl genetischer Untersuchungen diverse Mutationen in verschiedenen Krankheitsgenen identifiziert werden. Aktuelle Zahlen lassen vermuten, dass in circa 35% der DCM-Fälle ein genetischer Defekt zur Erkrankung geführt hat.

Die dilatative Kardiomyopathie ist die am häufigsten auftretende Form aller Kardiomyopathien mit systolischer Funktionseinschränkung. Die Inzidenz in den westlichen Industrieländern liegt bei 5-8 Fällen pro 100.000 Einwohner und Jahr mit ansteigender Tendenz, die Prävalenz bei circa 36 pro 100.000 (Dec und Fuster, 1994). Aufgrund des milden symptomatischen Verlaufs zu Beginn der Erkrankung ist die Dunkelziffer hoch, so dass von höheren Erkrankungszahlen ausgegangen werden muss (Erdmann, 2009). Im Allgemeinen manifestiert sich die DCM klinisch in der dritten und vierten Lebensdekade, kann aber auch schon bei Kleinkindern auftreten. Männer sind mit einem Verhältnis von 2:1 doppelt so häufig betroffen als Frauen. Die dilatative Verlaufsform ist nach der ischämischen Herzerkrankung und der hypertensiven Kardiomyopathie die dritthäufigste Ursache für ein Herzversagen (Maron et al., 2006). Die 5-Jahresüberlebensrate liegt je nach zugrunde liegender Ätiologie bei circa 25% (Durand et al., 1995). Die einzige kurative Therapie ist die Durchführung einer Herztransplantation. Aus diesem Grund stellt die DCM-Erkrankung mittlerweile die Hauptindikation für eine Herztransplantation dar. Die dilatative Kardiomyopathie ist durch eine echokardiographisch nachweisbare Erweiterung sowie verminderte Kontraktionskraft des linken oder beider Ventrikel charakterisiert. Dabei sind die Herzwände normal dick (normal: linker Ventrikel 10-12 mm, rechter Ventrikel 3-4 mm) oder verdünnt. Aufgrund der verminderten Kontraktionskraft ist die Auswurfleistung des Herzens verringert. Das Herzminutenvolumen (HMV) ist ein wichtiger Indikator für die kardiale Pumpfunktion und lässt sich aus dem Produkt von Schlagvolumen (SV) und Herzfrequenz (Hf) berechnen:

$$\text{HMV [l/min]} = \text{SV [l]} \times \text{Hf [1/min]}$$

Durch den Frank-Starling-Mechanismus kann das Schlagvolumen im Anfangsstadium der Erkrankung oft noch annähernd aufrechterhalten werden. Der Frank-Starling-Mechanismus beschreibt mit der Längen-Kraft-Beziehung den Zusammenhang zwischen Vordehnung und Kraftentwicklung des Herzmuskels. So resultiert aus einem Anstieg des linksventrikulären enddiastolischen Füllungsdrucks über eine vermehrte Vordehnung des linken Ventrikels eine Zunahme der Muskelfaserverkürzung sowie eine Steigerung des Schlagvolumens. Bei einer manifesten Herzinsuffizienz ist aufgrund der reduzierten Kontraktilität die Frank-Starling-Kurve nach unten verschoben. Eine Zunahme des Schlagvolumens kann somit nur über eine überproportionale Erhöhung der Vorlast erreicht werden, was auf Dauer wiederum zu einer Ventrikeldilatation beiträgt (Weil und Schunkert, 2006).

Auch über Veränderungen in lokalen neurohormonalen Systemen im Herzen, dem adrenergen System und dem Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS), versucht der Organismus eine Kontraktilitätssteigerung zu erreichen, um eine ausreichende Perfusion der lebenswichtigen Organe zu gewährleisten. Doch führen die andauernde Druck- und Volumenüberlastung über molekulare Prozesse langfristig zu strukturellen Veränderungen des Herzens (kardiales Remodelling). Makroskopisch fällt das stark vergrößerte Herz, das ein Gewicht von bis zu 1000 g (normal: circa 300 g) erreichen kann, auf (Luk et al., 2009). Ab dem so genannten kritischen Herzgewicht von 500 g kommt es zu einer relativen Koronarinsuffizienz. Die Koronarien können ab einer bestimmten Wanddicke die Sauerstoffversorgung des Herzens nicht mehr gewährleisten. Mikroskopisch sind eine Hypertrophie und Apoptose von Kardiomyozyten sowie eine Zunahme des kollagenen Netzwerkes sichtbar. Letzteres setzt die passive Dehnung des Herzmuskels herab und hat eine diastolische Funktionsstörung zur Folge. Letztendlich erlauben alle Gegenregulationsmechanismen bei insuffizienter Herzarbeit nur eine kurzfristige Stabilisierung der Myokardfunktion und Aufrechterhaltung der Perfusion lebenswichtiger Organe. Bei chronischer Aktivierung tragen dieselben Mechanismen allerdings zum Fortschreiten der Erkrankung bei, womit ein verhängnisvoller Circulus vitiosus entsteht (Woisetschläger, 2006).

Symptome der DCM präsentieren sich schleichend und werden meistens erst manifest, wenn die Erkrankung bis zu ihrem Endstadium fortgeschritten ist

(Luk et al., 2009). Die klinischen Anzeichen der DCM sind sehr heterogen. Oft zeigen sich Symptome einer Linksherzinsuffizienz, die mit weiterer Progression der Erkrankung in eine Globalinsuffizienz münden kann. Leitsymptome sind eine Belastungsdyspnoe und körperliche Schwäche. Als Zeichen der Rechtsherzinsuffizienz können sich Beinödeme, Aszites und eine Stauungsniere entwickeln. Als mögliche Komplikationen können arterielle und pulmonale Embolien infolge kardialer Thrombenbildung, Arrhythmien (Vorhofflimmern, supra- und ventrikuläre Tachykardien) und der plötzliche Herztod auftreten. Die Schwere und Progression der Erkrankung variiert aufgrund der heterogenen Genese (Luk et al., 2009). Der klinische Verlauf einer DCM ist beim individuellen Patienten nicht immer vorhersehbar und zudem vom zugrunde liegenden pathogenetischen Prozess abhängig. Die Prognose hingegen ist wesentlich mit dem Grad der systolischen Funktionseinschränkung des linken Ventrikels zum Zeitpunkt der Diagnosestellung assoziiert (**Tab. 2.1.2**). Es gilt vereinfacht: je schlechter die Pumpleistung, desto ungünstiger die Prognose.

**Tab. 2.1.2: Hämodynamische Stadieneinteilung der DCM.**

Stadium	Ejektionsfraktion	Charakteristikum
I	EF 50-65%	leichte Kontraktionsstörung
II	EF 30-49%	mittelgradige Kontraktionsstörung
III	EF < 30%	hochgradige Kontraktionsstörung

In den meisten Fällen ist der Verlauf der DCM durch eine kontinuierliche Progression der Erkrankung gekennzeichnet. Klinisch stabile Phasen oder spontane Remissionen sind sehr selten. Die Prognose einer symptomatischen DCM ist mit einer jährlichen Letalität von 10% und einer 10-Jahresüberlebensrate von 10-30% ungünstig. Die hämodynamischen Folgen der progredienten Herzinsuffizienz sowie ventrikuläre Herzrhythmusstörungen stellen die häufigste Todesursache dar.

## 2.2 Genetische Grundlagen der dilatativen Kardiomyopathie

Bereits 1961 schrieb A.G. Whitfield vom Queen Elizabeth Hospital der University of Birmingham, nachdem er mehrere Patienten mit einer Herzmuskelerkrankung und deren Familien untersucht hatte: „*There can be no doubt about the existence of familial cardiomyopathy as a clinical entity*“. Schon viele Jahre vorher veröffentlichten andere Kliniken Fallberichte, die diese Aussage bekräftigten (Evans, 1949; Blanshard, 1953; Gaunt und Lecutier, 1956). In vielen Fallberichten wurde von mehreren Familien berichtet, in denen ebenfalls ein gehäuftes Vorkommen von Kardiomyopathien beobachtet wurde. Doch wurde die Erkrankung aufgrund ihrer morphologischen Erscheinung damals als „familiäre Kardiomegalie“ beschrieben. Seitdem wurden etliche prospektive Studien in Form von systematischen Untersuchungen von DCM-Patienten und ihren Familienangehörigen durchgeführt (Fuster et al., 1981; Michels et al., 1992). Schließlich demonstrierten mehrere Arbeitsgruppen das Vorliegen einer möglichen genetischen Übertragung (Mestroni et al., 1990). Nach aktuellem Forschungsstand wird davon ausgegangen, dass bis zu einem Drittel der DCM-Fälle familiär bedingt sind (Osterziel und Perrot, 2005). Eine DCM wird heute als familiär bezeichnet, wenn mindestens zwei Familienmitglieder erkrankt sind oder ein Verwandter ersten Grades vor dem 35. Lebensjahr einen plötzlichen Herztod unbekannter Ursache erlitten hat (Luk et al., 2009).

In Anlehnung an die Studie von Mestroni und Mitarbeitern lassen sich mehrere Erbgänge differenzieren. In über 50% der Fälle wird eine Erkrankung an familiärer dilatativer Kardiomyopathie (FDC) autosomal-dominant vererbt. Somit trägt durchschnittlich die Hälfte der Kinder eines Betroffenen ebenfalls die ursächliche Mutation. Eine autosomal-rezessive Vererbung findet sich nur bei 16% der Erkrankungen. Patienten dieses Erbganges sind im Vergleich zur autosomal-dominanten Form signifikant jünger und ihr Krankheitsverlauf weist eine schlechtere Prognose auf. Weniger häufig auftretende Vererbungsformen sind der X-chromosomale Erbgang infolge von Mutationen im Dystrophin-Gen (10%), die matrilineale Vererbung, die auf Mutationen im mitochondrialen Genom beruht und ausschließlich über die Mutter auf das Kind vererbt werden kann, und seltene, nicht weiter klassifizierte Formen

(7%). Zudem ist die Penetranz der Erkrankung altersabhängig und dabei sehr variabel. In einigen Familien sind bereits Kinder und Jugendliche betroffen, wohingegen andere Mitglieder einer Familie erst später erkranken. In den meisten Fällen wird die Penetranz in der vierten bis fünften Lebensdekade aber nahezu komplett, so dass um das 50. Lebensjahr die Mehrzahl der Mutationsträger erkrankt ist. Wie bei vielen Mendelschen Erkrankungen beeinflussen offenbar auch hier zusätzliche, genetische und nicht-genetische Faktoren die Ausprägung des Phänotyps (Schönberger et al., 2004).

Durch Kopplungsanalysen und die Analyse von Kandidatengenen bei Familien mit DCM wurde in den letzten Jahren eine Vielzahl von krankheitsverursachenden Genen entdeckt (**Tab. 2.2**). 1998 waren es Olson et al., die in zwei Familien Mutationen im alpha-Aktin-Gen (ACTC) entdeckten. Damit war das erste Gen, das an der Entstehung einer reinen DCM beteiligt ist, identifiziert. Beide Missense-Mutationen wurden in evolutionär hochgradig konservierten Regionen des kardialen Aktins gefunden. Veränderungen in diesem Domänenbereich können mit hoher Wahrscheinlichkeit einen funktionellen Nachteil für das Protein mit sich bringen. Da das ACTC und weitere, später entdeckte Gene alle für zytoskelettäre Proteine kodieren, entwickelte sich die Hypothese, dass es sich bei der DCM um eine Zytoskelettopathie handelt. Man vermutete eine aufgrund der Mutationen gestörte Kraftübertragung vom Sarkomer, dem Kraft-erzeugenden Apparat, auf die extrazelluläre Matrix (Bowles et al., 2000).

Allerdings wurden weitere Krankheitsgene identifiziert, die nicht dem Zytoskelett zuzuordnen sind, sondern an der Funktion anderer Komponenten der Herzmuskelzelle, wie zum Beispiel den Ionenkanälen, beteiligt sind. Des Weiteren sind fünf Genorte bekannt, für die bisher noch kein krankheitsassoziiertes Gen gefunden wurde. Aktuelle Zahlen belegen, dass Mutationen in den krankheitsassoziierten Genen für Titin, beta-Myosin und Laminin A/C jeweils für 5-10% der familiären DCM-Fälle verantwortlich zu sein scheinen; Mutationen im Dystrophin-Gen sogar für 10-15% der Erkrankungen von Männern (Sinagra et al., 2001).

**Tab. 2.2 : Übersicht der chromosomalen Loci und krankheitsassoziierten Gene bei dilatativer Kardiomyopathie als dominierendem Phänotyp.**

Genort	Gen	Erbgang	Protein	Referenz
1q21.2-q21.3	LMNA	AD	Lamin A/C	Fatkin et al., 1999
1q32	TNNT2	AD	Troponin T	Kamisago et al., 2000
1q43	ACTN2	AD	$\alpha$ -Aktinin 2	Mohapatra et al., 2003
2q31	TTN	AD	Titin	Gerull et al., 2002
2q35	DES	AD	Desmin	Li et al., 1999
3p21	SCN5A	AD	kardialer Natrium-Kanal $5\alpha$	McNair et al., 2004
3p21.3-p14.3	TNNC1	AD	Troponin C	Mogensen et al., 2004
5q33-q34	SGCD	AD	$\delta$ -Sarcoglycan	Tsubata et al., 2000
6q22.1	PLN	AD	Phospholamban	Schmitt et al, 2003
6q23-q24	EYA4	AD	Eyes absent homolog 4	Schönberger et al., 2005
10q21-q23	VCL	AD	Metavinculin	Olson et al., 2002
10q23.31	ANKRD1	AD	CARP	Moulik et al., 2009; Duboscq-Bidot et al., 2009
11p15.1	CSRP3/ MLP	AD	Muskel-LIM-Protein	Knöll et al., 2002
12p12.1	ABCC9	AD/S	Sulfonylharnstoff-Rezeptor 2A	Bienengräber et al., 2004
14q11	MYH6	AD	$\alpha$ -Myosin-Schwerkette	Carniel et al., 2005
14q12	MYH7	AD	$\beta$ -Myosin-Schwerkette	Kamisago et al., 2000
15q11-q14	ACTC	AD	kardiales $\alpha$ -Aktin	Olson et al., 1998
15q22.1	TPM1	AD	$\alpha$ -Tropomyosin	Olson et al., 2001
17q12	TCAP	AD	Titin-Cap/Telethonin	Knöll et al., 2002
17q21	DSP	AR	Desmoplakin	Coonar et al, 1998
19q13.4	TNNI3	AR	Troponin I	Murphy et al., 2004
Xp21	DMD	X	Dystrophin	Muntoni et al., 1993
Xq28	TAZ	X	Tafazzin	Bione et al., 1996
2q14-q22	unbekannt	AD	unbekannt	Jung et al., 1999
6q12-q16	unbekannt	AD	unbekannt	Sylvius et al., 2001
6q23	unbekannt	AD	unbekannt	Messina et al., 1997
9q13-q22	unbekannt	AD	unbekannt	Krajcinovic et al., 1995
10q21-q23	unbekannt	AD	unbekannt	Bowles et al., 1996

AD=autosomal-dominant; AR=autosomal-rezessiv; X=X-chromosomal; S=sporadisch.

Das in dieser Arbeit untersuchte Ankyrin-Repeat-Domain-1-Gen (ANKRD1), wurde erst 2009 als neues Krankheitsgen fast zeitgleich sowohl von Moulik et al. als auch von Duboscq-Bidot et al. identifiziert. Es wird derzeit in circa 2% der Fälle für die Entstehung einer DCM verantwortlich gemacht.

Das Ankyrin-Repeat-Domain-1-Gen (ANKRD1) ist ein unter den Säugetieren hoch-konserviertes Gen. Es ist beim Menschen auf dem Chromosom 10, bei Mäusen auf Chromosom 19 lokalisiert und in neun Exons und acht Introns aufgeteilt (**Abb. 2.2**). Das Gen kodiert für das kardiale Ankyrin-Repeat-Protein (CARP) mit einem molekularen Gewicht von circa 36 kDa. Seit 2009 sind drei verschiedene mRNA-Transkripte des ANKRD-1 bekannt:

*ankrd1* - neun Exons, keine Introns,

*ankrd1-i8* - neun Exons und das Intron 8 und

*ankrd1-i7, 8* - neun Exons und die Introns 7 und 8 kodierend.

Alle Transkripte sind funktional intakt und werden translatiert, die funktionelle Bedeutsamkeit der Varianten ist derzeit jedoch noch ungeklärt (Torrado et al., 2009).

Zunächst wurde CARP als ein Zytokin-induzierbares Kernprotein in mikrovaskulären Endothelzellen unter dem Namen C-193 identifiziert. Chu et al. stimulierten in ihrer, im Jahre 1995 durchgeführten Studie HDMEC- (human dermal microvascular endothelial cells) und HUVEC-Zellen (human umbilical vein endothelial cells) mit dem Tumornekrosefaktor-alpha (TNF- $\alpha$ ) bzw. Interleukin-1 $\alpha$  (IL-1 $\alpha$ ) und erstellten mit diesen eine cDNA-Bibliothek. Diese Bibliothek durchsuchten sie anschließend nach Zytokin-induzierten Genen und fanden das bis dahin noch unbekannte C-193 (Chu et al., 1995).

1997 entdeckten Zou et al. das Ankyrin-like-repeat-protein als den ersten Gewebe-spezifischen Bindungspartner für den ubiquitär vorkommenden Transkriptionsfaktor YB-1 (Y-Box Transkriptionsfaktor 1). Reguliert durch das Homöobox-Protein Nkx2-5 bindet CARP an YB-1 und verhindert somit seine Bindung am MLC-2v-Promotor (Ventrikel-spezifisches Myosin leichte Kette 2 Gen). Daraus resultiert eine Inhibierung der MLC-2v-Genexpression, die zu einer Herabregulation der Ventrikel-spezifischen Form der leichten Kette des Myosins führt. Das MLC-2v ist ein spezifisch ventrikuläres Gen, das die Genexpression der Kammern reguliert und einen spezifisch ventrikulären Marker für die Kardiogenese darstellt (Zou et al., 1997). Im gleichen Jahr identifizier-

ten Jeyaseelan et al. das Cardiac-Adriamycin-Response-Protein. Adriamycin (Doxorubicin) ist ein Chemotherapeutikum mit kardiotoxischen Nebenwirkungen (degenerative Kardiomyopathie). In Versuchen mit neonatalen Rattenkardiomyozyten zeigte sich bei der Exposition mit Adriamycin eine sensitive und rapide Abnahme der CARP mRNA-Halbwertszeit. Weil für CARP eine Repressorfunktion in der kardialen Genexpression postuliert wird, vermutete die Arbeitsgruppe einen Zusammenhang zwischen der Adriamycin-abhängigen CARP-Elimination und der kardiotoxischen Wirkung des Chemotherapeutikums (Jeyaseelan et al., 1997).

Aufgrund der verschiedenen Parallelbezeichnungen, C-193, CARP, MARP, MCARP, CRAP, wird in dieser Arbeit ausschließlich der von dem HUGO Gene Nomenclature Committee anerkannte Kurzname ANKRD1 (Ankyrin-Repeat-Domain 1) oder CARP (Cardiac-Ankyrin-Repeat-Protein) verwendet.

Das kardiale Ankyrin-Repeat-Protein (CARP) gehört zur Proteinfamilie der Muscle-Ankyrin-Repeat-Proteine (MARPs). Seine Sequenz besteht aus 319 Aminosäuren und ist unter Säugetieren hochgradig konserviert. Das Protein ist durch seine vier am C-Terminus liegenden Ankyrin-Repeats charakterisiert (**Abb. 2.2**). Diese zeigen eine L-förmige Konformation und bieten eine geeignete Oberfläche für Protein-Protein-Interaktionen. So besitzt der zweite Ankyrin-Repeat zum Beispiel eine Bindestelle für die elastische N2A-Domäne des myofibrillären Proteins Titin (Miller et al., 2003). Bereits 1987 berichteten Breeden und Nasmyth über ein sich wiederholendes, 33 Aminosäure langes, repetitives Element in den Regulatoren des Hefe Zell-Zyklus. Drei Jahre später wurden 24 Kopien dieser Sequenz im zytoskelettalen Protein Ankyrin wieder gefunden, woraus die Namensgebung *Ankyrin Repeat* resultierte (Lux et al., 1990). Mittlerweile sind Ankyrin-Repeats in über 400 Proteinen gefunden worden, die unter anderem an der Transkriptionsregulation, Signaltransduktion, Zellzyklus-Regulation, Zell-Zell-Adhäsion, Zytoskelett-Integrität und an Entzündungsprozessen beteiligt sind (Sedgwick et al., 1999).

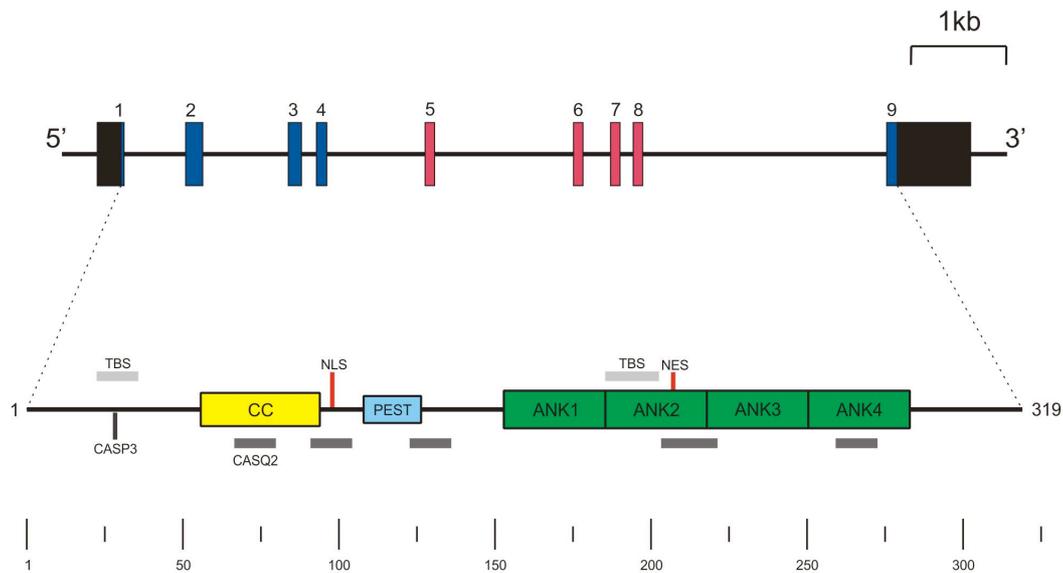
**Abb. 2.2: Struktur des ANKRD1-Gens sowie des kardialen Ankyrin-Repeat-Proteins.**

Abbildung oben: Struktur des ANKRD1-Gens. Die Exons sind in Form von blauen und roten Balken dargestellt und nummeriert. Letztere kodieren für die vier Ankyrin-Repeats im CARP-Molekül.

Abbildung unten: Struktur von CARP. Eingezeichnet sind bekannte Sequenzen und Bindungsstellen: ANK1-4=Ankyrin-Repeats 1-4; CC=Coiled-Coil-Domäne; CASP3=Caspase-3-Interaktion; PEST=Prolin/Glutamat/Serin/Threonin-reiche Sequenz; CASQ2=Calsequestrin-2-Interaktionen (dunkelgraue Balken); NLS/NES=Nukleäres-Lokalisations-/Export-Signal; TBS=Titin-Bindestelle (hellgraue Balken).

CARP verfügt außerdem über ein am N-Terminus lokalisiertes Nukleäres-Lokalisations-Signal (NLS) und ein Nukleäres-Export-Signal (NES), das sich im zweiten Ankyrin Repeat befindet. Tatsächlich wurde nachgewiesen, dass CARP entweder im I-Band des Sarkomers oder im Kern von Kardiomyozyten lokalisiert sein kann. Des Weiteren besitzt CARP auf mRNA und Proteinebene mehrere Elemente, die für eine kurze Halbwertszeit und hohe Degradation des Transkripts und Proteins verantwortlich sind: eine Degradation-Sequenz im 3'-UTR der mRNA, eine AU-Repeat-reiche Region, eine PEST-reiche Sequenz (Prolin/Glutamat/Serin/Threonin) und viele hypothetische Phosphorylierungs-, Myristoylierungs- und Glykosylierungsstellen. Diese vielen möglichen Formen der Proteinmodifikationen deuten darauf hin, dass die Expression und Aktivität dieses Proteins auf posttranskriptionaler Ebene stark reguliert wird (Samaras et al., 2007).

Die Struktur des Proteins lässt zudem Interaktionen mit anderen Proteinen vermuten. Aus diesem Grund wurden einige Protein-Interaktionsstudien am CARP durchgeführt: Mit dem Hefe-Zwei-Hybrid-System konnte CARP als Bindungspartner für den Transkriptionsfaktor YB-1 identifiziert werden (Zou et al., 1997). Mit der gleichen Methode wurde auch die Bindung zwischen CARP und Titin, Myopalladin bzw. der Calpain-Protease p94 in einem Multiproteinkomplex bewiesen und mittels immunhistochemischer Fluoreszenzfärbung sichtbar gemacht (Miller et al., 2003). Die Interaktion zwischen CARP und Myopalladin scheint für die Aufrechterhaltung der Stabilität des Sarkomers entscheidend zu sein, die CARP-Titin-Bindung hingegen essentiell für das myofibrilläre Signalsystem und das Stretch-Sensing des Herzmuskels (Torrado et al., 2005). Mit dem Pull-down-Assay, der Co-Immunopräzipitation und dem *In-Vitro*-Binding-Assay entdeckten Torrado und Mitarbeiter eine starke und selektive Bindung zwischen CARP und dem kardialen Calsequestrin 2 (CASQ2). Das CARP besitzt fünf Bindestellen für das CASQ2, die über das ganze Protein verteilt sind (**Abb. 2.2**). Drei von ihnen sind in den Ankyrin-Repeats 2, 3 und 4 lokalisiert. Welche Auswirkungen die Interaktion beider Proteine auf die kardiale elektromechanische Kopplung *in vivo* haben könnte, werden zukünftige Studien zeigen müssen (Torrado et al., 2005).

Weitere Untersuchungen wiesen auf eine schwache Homodimerisierung des CARP hin. Die strukturelle Voraussetzung für eine Dimerisierung stellt das N-terminal gelegene Coiled-Coil-Dimerisierungsmotiv dar. Vermutlich kann der aminoterminal Teil des CARP mit sich selbst interagieren. Auch in den anderen beiden Proteinen der MARP-Familie ist eine Coiled-Coil-Domäne vorhanden. Eine Heterodimerbildung innerhalb der MARPs konnte nicht nachgewiesen werden. Dafür ist das CARP in der Lage, Heterodimere mit Desmin, einem Coiled-Coil-Protein, das in der Z-Scheibe gelegen ist, zu bilden. Diese Heterodimerisierung könnte die Lokalisation von CARP in der Z-Region des Sarkomers erklären (Witt et al., 2005).

Zu der MARP-Proteinfamilie gehören neben dem CARP zwei weitere Proteine, das Ankrd2 (Ankyrin-Repeat-Domain-2-Protein) und das DARP (Diabetes-Related-Ankyrin-Repeat-Protein). Auf Proteinebene besteht eine circa

50%-ige Sequenzhomologie und eine ähnliche intrazelluläre Verteilung. Alle drei Proteine besitzen vier der namensgebenden Ankyrin-Repeats.

Das Ankrd2 wurde kurze Zeit nach dem CARP identifiziert. Es ist diesem strukturell sehr ähnlich, kommt aber überwiegend in den roten Muskelfasern, Typ-I-Fasern, des Skelettmuskels vor. Versuche zeigten, dass auf den Skelettmuskel ausgeübter mechanischer Stress oder Denervation zu einer vermehrten Expression des Ankrd2 führt. Somit könnten das Ankrd2 und CARP eine ähnliche Rolle in dem bisher noch unbekanntem Signalweg für die Entstehung einer Stress-induzierten Hypertrophie des Herzmuskels (CARP) bzw. des Skelettmuskels (Ankrd2) spielen (Kemp et al., 2000). Des Weiteren ist das Ankrd2 sowohl in der Z-Scheibe des Sarkomers als auch im Nukleus lokalisiert und interagiert mit den Transkriptionsfaktoren YB-1, PML (promyelocytic leukemia protein) und p53. Unter Hypertrophiebedingungen kann es so zwischen Zytoplasma und Kern translozieren und eine funktionale Verbindung zwischen beiden Kompartimenten herstellen. Über die Bindung an Transkriptionsfaktoren scheint Ankrd2, die Genexpression muskelspezifischer Proteine zu regulieren (Kojic et al., 2004).

Das DARP wurde 2003 von Ikeda et al. identifiziert. In Versuchen mit Diabetes mellitus Typ II- und Insulin-resistenten Mäusen beobachteten sie eine Hochregulierung der DARP-Expression. Diese beschränkt sich ausschließlich auf den Skelettmuskel, das Herz und braunes Fettgewebe. Weitere Versuche zeigten wiederum eine veränderte Genexpression in Abhängigkeit von der Energieversorgung und den metabolischen Bedingungen. Dabei resultierte Fasten in einer signifikant geringeren und eine exzessive Fettsäuregabe in einer erhöhten DARP-Expression. Diese Befunde legen den Verdacht nahe, dass das nukleäre Protein eine Rolle im Energiestoffwechsel spielt (Ikeda et al., 2003). Neben dem CARP und dem Ankrd2 bildet auch das DARP einen Multiproteinkomplex mit Titin, Myopalladin und der Calpain-Protease p94. Miller und Kollegen wiesen mit Hilfe von Immunfluoreszenzfärbungen die Anwesenheit von CARP und DARP im I-Band des Sarkomers und im Nukleus von fetalen und adulten Kardiomyozyten nach. Nach 10%-iger passiver Dehnung der fetalen Rattenkardiomyozyten über 90 Minuten zeigte sich in der Immunfluoreszenzfärbung eine Signalzunahme beider Proteine im Kern und an den Myofibrillen. Interessanterweise wurde für DARP

zusätzlich ein intensiveres Signal an den Glanzstreifen (Disci intercalares) detektiert. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass beide Proteine auf Stress reagieren, dabei aber mit unterschiedlichen, subzellulären Strukturen assoziieren (Miller et al., 2003).

Trotz der hohen Sequenzhomologie innerhalb der MARP-Proteinfamilie besteht bei Fehlen eines der Proteine keine Heraufregulierung oder Kompensation durch die verbliebenen zwei anderen Proteine. Dies zeigte eine erst kürzlich durchgeführte Studie von Barash und Mitarbeiter (2007). Zudem untersuchte die Arbeitsgruppe die Auswirkungen des Fehlens der ganzen MARP-Familie mit Hilfe von Triple-Knock-Out-Mäusen. Morphologisch machten sich am Skelettmuskel nur kleine Effekte bemerkbar, wie zum Beispiel eine veränderte Fasergröße und Fasertyp-Verteilung. Nach einmaliger exzentrischer Kontraktion zeigten sich jedoch signifikante Unterschiede in der Regeneration der Muskulatur. Somit lässt sich vermuten, dass die MARP-Familie eine wichtige Rolle für die normale Struktur und Funktion des Skelettmuskels spielt, in dem sie für Stabilität innerhalb der Sarkomere sorgt, den Muskel vor Überdehnung schützt und die Genexpression anderer, an der Muskelaktivität beteiligter Proteine reguliert.

Die Ergebnisse zeigen zudem, dass die drei Proteine nicht nur strukturelle, sondern auch funktionelle Homologien aufweisen, da alle drei Gene deletiert werden mussten (Tripel-Knock-out-Maus), um eine signifikante Veränderung der Muskelleistung beobachten zu können (Barash et al., 2007).

### **2.3 Zielsetzung der Arbeit**

Durch Kopplungsanalysen und der Analyse von Kandidatengenomen bei Familien mit DCM konnten in den letzten Jahren über 20 verschiedene, krankheitsverursachende Gene identifiziert werden. Eines dieser Gene ist das Ankyrin-Repeat-Domain-1-Gen (ANKRD1), das für das kardiale Ankyrin-Repeat-Protein (CARP) kodiert. Erst kürzlich wurde es im Rahmen von Mutationsscreenings von Moulik et al. und Duboscq-Bidot et al. als neues krankheitsassoziiertes Gen entdeckt. Beide Arbeitsgruppen untersuchten das ANKRD1-Gen mittels direkter Sequenzierung oder Hochleistungsflüssigkeits-

chromatographie (HPLC) auf Mutationen in Patientenkollektiven, die sowohl familiäre als auch idiopathische DCM-Patienten einschlossen. Im Anschluss an das Mutationsscreening wurden weitere funktionale Untersuchungen mit den gefundenen Mutanten durchgeführt. In Anlehnung an diese genetischen und funktionellen Untersuchungen von bereits analysierten CARP-Mutanten wird das ANKRD1-Gen derzeit in zwei Prozent der Fälle mit der Entstehung einer DCM in Zusammenhang gebracht.

Das Ziel der vorliegenden Dissertation stellt die weitere Untersuchung der Rolle des CARP in der Pathogenese der DCM dar. Zu diesem Zweck soll das ANKRD1-Gen in einem Kollektiv aus DCM-Patienten auf noch nicht identifizierte, krankheitsrelevante genetische Veränderungen, wie Punktmutationen, Deletionen oder Insertionen, untersucht werden. Folgende Methoden werden dafür zur Anwendung kommen: Polymerase-Ketten-Reaktion, Agarose-Gelelektrophorese, Einzelstrang-Konformations-Polymorphismus-Analyse (SSCP) und DNA-Sequenzierung. Im Anschluss an das Mutationsscreening wird die Korrelation der genetischen Befunde mit den klinischen Daten der entsprechenden Patienten angestrebt.

## 3 Material

### 3.1 Geräte

Tab. 3.1: Verwendete Geräte und ihre Hersteller.

<u>Gerät</u>	<u>Hersteller</u>
<b>Analysenwaage, pH-Elektroden</b>	
Analysenwaage	Kern (Balingen)
pH-Meter	Mettler Toledo (Gießen)
<b>Inkubatoren, Schüttler, Sterilarbeit</b>	
Autoklav	Memmert (Schwabach)
Magnetrührer	Heidolph (Kelheim)
Schüttler Rax control	Heidolph
Sterilisator	Systemec (Wettenberg)
Vortexer	Heidolph
<b>Kühl- und Gefrierschränke</b>	
Gefrierschrank (-20°C)	Liebherr (Bulle, Schweiz)
Kühlschrank (4°C)	Liebherr
<b>Zentrifugen</b>	
Tischzentrifuge	LMS Co. (Stützerbach)
Zentrifuge	Beckman (Krefeld)
<b>Sonstige Geräte</b>	
Elektrophoresekammer	Pharmacia Biotech (Freiburg)
Gelkammer	Biometra (Göttingen)
Mikrowelle	AFK (Hamburg)
Multipipette	Eppendorf (Hamburg)
PCR-Thermocycler	AVISO (Jena)
Pipetten (10,20,200,1000µl)	Eppendorf
Stromquellen	Biometra (Göttingen), Consort (Turnhout, Belgien)
UV-Transilluminator	Bio-Rad (Brüssel, Belgien)
Wasserreinigungsanlage, MilliQ	Millipore (Schwalbach)

## 3.2 Chemikalien

Tab. 3.2: Verwendete Chemikalien und ihre Hersteller.

### PCR

Biotaq DNA-Polymerase	Bioline (Luckenwalde)
Desoxynukleotide	Roche Applied Biosystems (Mannheim)
Magnesiumchlorid	Bioline
PCR-Puffer	Bioline
Primer	siehe unten
Wasser	5 Prime (Hamburg)

### Agarosegelelektrophorese

Agarose	Invitrogen (Karlsruhe)
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Loading-buffer	5 Prime
100 bp DNA-Marker	Roche Applied Science

### SSCP

Acrylamid/Bis Rotiphorese	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
APS	Carl Roth GmbH
Bromphenolblau	Merck (Darmstadt)
Ethanol	Merck
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich
Formamid	Carl Roth GmbH
Glycerin	Merck (Darmstadt)
Natriumhydroxid	Merck
TEMED	Amersham Biosciences (Freiburg)
Xylencyanol	Merck

### DNA-Reinigung

Exo/SAP	USB Europe GmbH (Staufen)
---------	------------------------------

### 3.3 Sonstige Materialien

Weitere in dieser Arbeit verwendete Verbrauchsmaterialien sind in den Kapiteln über die Beschreibung einzelner Methoden angegeben. Alle anderen Verbrauchsmaterialien wurden von Eppendorf (Hamburg), Sarstedt (Nümbrecht), Greiner (Finkenhausen), Carl Roth GmbH (Karlsruhe), Bio-Rad (Brüssel, Belgien), Nunc (Roskilde, Dänemark), Peqlab (Erlangen) und Biometra (Göttingen) bezogen.

### 3.4 Puffer

#### TBE-Puffer

Der fünffach TBE-Puffer enthält die folgenden Komponenten: Trishydroxymethylaminomethan (Acros Organics, Geel, Belgien), Borsäure (Fisher Scientific, Loughborough, UK) und Ethylendiamintetraessigsäure (Acros Organics, Geel, Belgien). In einem Liter entionisiertem Wasser aus der Millipore-Anlage Milli Q (Millipore, Schwalbach) wurden 54 g Tris-Base, 27,5 g Borsäure und 20 ml einer 0,5 molaren EDTA-Lösung gelöst und anschließend der pH-Wert mit Hilfe des pH-Meter Seven Easy (Mettler Toledo, Gießen) auf den pH-Wert 8,0 eingestellt.

### 3.5 PCR-Primer

Die in dieser Arbeit verwendeten Primer (**Tab. 3.5**) wurden mit dem Softwareprogramm Primer3 konzipiert und bei der Firma TibMolBiol (Berlin) bestellt.

Tab. 3.5: Zusammenstellung der in dieser Arbeit verwendeten Primer.

Name	Sequenz	bp	Annealing Temp.
<b>CARP 1F:</b> <b>CARP 1R:</b>	5'AGGTTGGAAGATTATCTCACCC-3' 5'-TCAGAGTTCCCTTGCATTACAC-3'	255 (126-381)	60 °C
<b>CARP 2F:</b> <b>CARP 2R:</b>	5'-GTAATTCTGGGACAATTGTAGC-3' 5'-CAATCAAAACATGGTCACAGCA-3'	588 (754-1342)	58 °C
<b>CARP 3/4F:</b> <b>CARP 3/4R:</b>	5'-CATGTTTATCTCAGACCTTGCA-3' 5'-AACAGCTGGGGAAACTGTTTCA-3'	621 (1911-2532)	60°C
<b>CARP 5F:</b> <b>CARP 5R:</b>	5'-CCTTTGAGCCCTTGGAATGTA-3' 5'-CTCGGTTTTGCATTGGAGGTTT-3'	405 (3221-3626)	60°C
<b>CARP 6F:</b> <b>CARP 6R:</b>	5'-CAATCTAGATGGGGACAACCTCA-3' 5'-GGGAGAAGGAGAAGAAGGAATAC-3'	230 (5128-4898)	60°C
<b>CARP 7F:</b> <b>CARP 7R:</b>	5'-TGTGTGCAGGCACCCTAGT-3' 5'-TGGGGGAGTGATTCCAAATA-3'	274 (5287-5561)	60°C
<b>CARP 8F:</b> <b>CARP 8R:</b>	5'-TCAACGCCAAAGACAGAGTGAG-3' 5'-GGGTCCTAGCCAAGATAAACAC-3'	420 (5478-5898)	62°C
<b>CARP 9F:</b> <b>CARP 9R:</b>	5'-CCTGGTGGAAACCATAAACAC-3' 5'-TCTGAATATCAGTAGCGTGGCA-3'	475 (8172-8647)	60°C

Angegeben sind die Bezeichnung und Sequenz der verwendeten Primer, das erwartete PCR-Produkt mit Angabe der Basenpaare (bp) und die verwendete Annealing-Temperatur für den jeweiligen PCR-Durchlauf.

### 3.6 Untersuchungsmaterial

Das in dieser Arbeit untersuchte Patientenkollektiv wurde im Rahmen eines DCM-Projektes der Philipps-Universität Marburg in das Kompetenznetz Herzinsuffizienz Berlin aufgenommen. Die für das Mutationsscreening notwendige Patienten-DNA wurde aus EDTA-Blut nach Standardmethoden isoliert und für die vorliegende Arbeit zur Verfügung gestellt. Alle Patienten sind vor der Blutentnahme über die geplanten molekulargenetischen

Untersuchungen informiert worden und haben ihr schriftliches Einverständnis zur Verwendung ihrer DNA für Forschungszwecke gegeben.

Des Weiteren wurden die Stammdaten aller Patienten bei Einschluss in das DCM-Projekt als medizinische Befunde in eine Datenbank aufgenommen. Diese beinhalten unter anderem Angaben zu Alter und Geschlecht, Familienanamnese und Symptomatik der Patienten. Als diagnostische Daten wurden echokardiographische und invasiv ermittelte hämodynamische Parameter sowohl bei der Aufnahme in das Kompetenznetz als auch bei den Nachuntersuchungen erfasst.

## 4 Methoden

### 4.1 Polymerase-Kettenreaktion

Die Patienten-DNA wurde mittels der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) nach Mullis amplifiziert. Mit diesem Verfahren können Nukleotidsequenzen *in vitro* exponentiell vervielfältigt werden und somit weiteren molekulargenetischen Methoden zugänglich gemacht werden (Mullis und Faloona, 1987). Mit der PCR lassen sich beliebig lange DNA-Sequenzen von bis zu 20.000 Basenpaaren vervielfältigen. Je nach Anzahl der durchlaufenen Zyklen können so bis zu  $10^7$  Kopien der DNA-Zielsequenz entstehen.

Folgende Komponenten werden für eine PCR benötigt: das Template bzw. die Matrize ist eine Nukleinsäure-Sequenz. Sie ist die Vorlage, die mittels der PCR amplifiziert werden soll. Dieses Template kann in Form von DNA oder RNA, einzelsträngig oder doppelsträngig vorliegen. Liegt sie in Form von RNA vor, muss die RNA mit Hilfe der reversen Transkription erst noch in DNA umgeschrieben werden. Eine weitere Komponente stellen die Primer (forward und reverse) dar. Sie sind zumeist DNA-Oligonukleotide, die mit Softwareprogrammen speziell für die gewünschte Amplifikation hergestellt werden. Beide Primer haben die Aufgabe mit dem zu vervielfältigenden DNA-Abschnitt zu hybridisieren und bilden den Startpunkt für das DNA-replizierende Enzym. Dieses ist die DNA-Polymerase I, die wohl wichtigste Komponente für eine erfolgreiche PCR. Alle DNA-Polymerasen katalysieren, entsprechend den Watson-Crick-Regeln für die Basenpaarung, die Bildung langer Polynukleotid-Ketten aus den einzelnen energiereichen Desoxyribonukleosid-Triphosphaten (dNTP's). Dabei benutzen sie einen der Parentalstränge als Vorlage, so dass ein Tochterstrang entsteht, der komplementär zum Elternstrang ist. Diese Polymerisation verläuft stets streng gerichtet vom 5'-Triphosphat des ersten Nukleotids zum 3'-OH-Ende. Als Bausteine für den Tochterstrang werden als weitere Komponente die vier Desoxyribonukleosid-Triphosphate (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) benötigt.

Der 25  $\mu$ l Reaktionsansatz für die Amplifikation der Patienten-DNA enthält 1  $\mu$ l DNA, 10 pmol eines jeden der beiden Primer, 20 nmol eines jeden der vier natürlich vorkommenden Desoxynukleotide (Roche Applied Biosystems), 10x

NH<sub>4</sub>-PCR-Reaktions-Puffer (Bioline), 50 nmol MgCl<sub>2</sub> und 0,65 Einheiten Bio-taq DNA-Polymerase (Bioline). Alle Reaktionsansätze wurden auf 96-Multiply-PCR-Platten (Sarstedt) pipettiert. Die PCR-Reaktion erfolgte standardisiert nach dem in **Tabelle 4.1** aufgeführten Thermoprofil in einem Thermocycler des Typs GeneAmp-PCR-System-2400 (Perkin Elmer). Um die Spezifität der Primer-Bindung an die DNA zu erhöhen und somit die Entstehung von Primer-Dimeren und Artefakten zu verringern, wurde ein Touch-Down-PCR-Temperaturprogramm verwendet. In diesem Programm wird in den ersten Zyklen der PCR mit höheren Annealing-Temperaturen begonnen, die zyklusweise reduziert werden. Dadurch wird die Spezifität der Produktausbeute erhöht und die Menge unspezifischer PCR-Amplifikate verringert.

**Tab. 4.1: Temperaturprogramm der Touch-Down-PCR.**

	<b>Denaturierung</b>	<b>Annealing</b>	<b>Elongation</b>	<b>Anzahl der Zyklen</b>
I	30 Sek. 95 °C	30 Sek. 68 °C	45 Sek. 72 °C	3
II	30 Sek. 95 °C	30 Sek. 65 °C	45 Sek. 72 °C	3
III	30 Sek. 95 °C	30 Sek. 63 °C	45 Sek. 72 °C	4
IV	30 Sek. 95 °C	30 Sek. 61 °C	45 Sek. 72 °C	6
V	30 Sek. 95 °C	30 Sek. 58 °C	45 Sek. 72 °C	6
VI	30 Sek. 95 °C	30 Sek. 55 °C	45 Sek. 72 °C	15

Dargestellt sind Dauer und Temperatur sowie die Zyklusanzahl der einzelnen Denaturierungs-, Annealing- und Elongationsschritte für das gewählte Touch-down-PCR-Programm.

Der eigentliche Ablauf der PCR-Reaktion begann mit einer 5-minütigen Denaturierung des DNA-Doppelstranges bei 95 °C. Daraufhin erfolgten 37 Zyklen mit jeweils 30 Sekunden Denaturierung bei 95 °C, 30 Sekunden Annealing bei je nach Zyklus 68-55 °C und eine 45-sekündige Elongation bei 72 °C. Zum Abschluss wurde eine einmalige 7-minütige Elongation bei 72 °C zum Auffüllen eventuell verbliebener kurzer Fragmente durchgeführt. Nach Beenden des PCR-Ablaufs und Abkühlen auf 4 °C, wurden die Proben aus dem

Thermocycler entnommen und bis zur weiteren Verwendung bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt.

## 4.2 DNA-Gelelektrophorese

Zur qualitativen und quantitativen Erfolgskontrolle der PCR wurden die PCR-Produkte auf einem Agarosegel aufgetrennt. Diese elektrophoretische Methode wurde in horizontalen Flachbettkammern durchgeführt und basiert auf dem Grundprinzip der Wanderung geladener Teilchen in einem elektrischen Feld. In diesem Fall stellte die DNA bzw. das PCR-Produkt das geladene Teilchen dar. Das elektrische Feld wurde über eine Stromquelle von außen an die Kammer angelegt. Aufgrund der Phosphatgruppen waren die DNA-Fragmente negativ geladen und wanderten langsam durch die Agarose-Gelmatrix zur Kathode. Die Agarose-Gelmatrix bestand aus vernetzten Agarosepolymeren. Durch die Vernetzung entstanden Poren im Gel, die eine Abhängigkeit zur Agarosekonzentration aufwiesen. Umso höher die gewählte Agarosekonzentration war, desto kleiner waren die Poren im Gel. Die DNA-Auftrennung erfolgte dementsprechend nach dem Siebeffekt. Kleinere DNA-Moleküle konnten sich folglich schneller durch das Gel bewegen als große Moleküle. Daraus resultierte schließlich die Auftrennung und Identifizierung von DNA-Fragmenten, denn allgemein gilt: die Wanderungsgeschwindigkeit von linearen DNA-Molekülen ist umgekehrt proportional zu dem dekadischen Logarithmus der Anzahl der Basenpaare bzw. des Molekulargewichts.

Das für die analytische Auftrennung eingesetzte Gel war 1,5%-ig bestehend aus 70 ml 0,5xTris-Borat-EDTA-Puffer (TBE) und 1,05 g Ultra Pure-Agarose (Invitrogen). Um die DNA für die Auswertung sichtbar zu machen, wurde außerdem 6  $\mu\text{l}$  Ethidiumbromid (Sigma-Aldrich) mit einer Konzentration von 0,1  $\mu\text{g}$  Ethidiumbromid/ml in die geschmolzene Agarose gegeben. Jeweils 5  $\mu\text{l}$  PCR-Produkt wurden mit 4  $\mu\text{l}$  Loading-Puffer (5 Prime) versetzt und in die Kammern pipettiert. Als Laufpuffer wurde 0,5xTBE, der aus 10xTBE (89 mM Tris-Base, 89 mM Borsäure, 2 mM Ethylendiamintetraessigsäure) angesetzt wurde, in die horizontale Gelkammer (Biozym) gegeben. Die Auftrennung erfolgte bei einer angelegten Spannung von 100 Volt und einer Laufzeit von

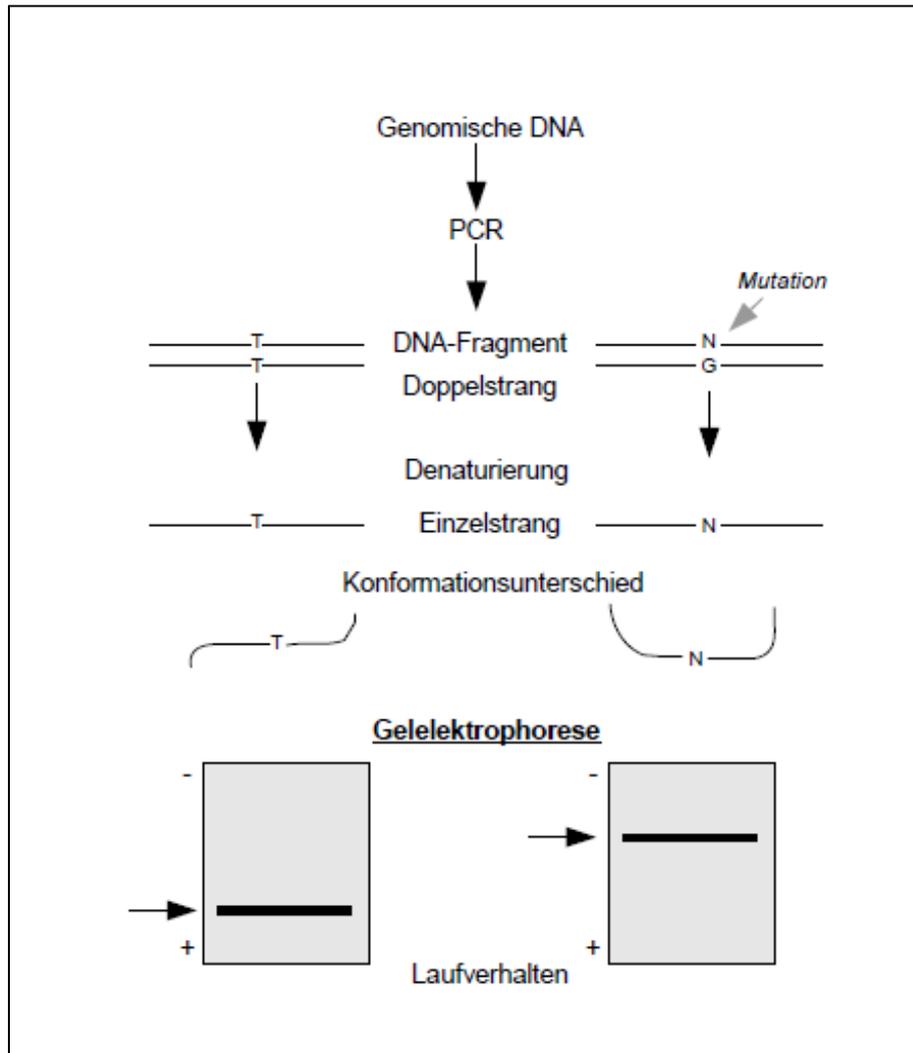
30 Minuten. Die DNA-Banden wurden nach elektrophoretischer Auftrennung im ultravioletten Licht einer Chemi-Doc-Dokumentationskammer (Bio-Rad) mit dem Softwareprogramm Quantity-One (Bio-Rad) ausgewertet. Als Molekulargewichts-Standard diente ein 100 bp DNA-Marker (Roche).

### 4.3 Einzelstrang-Konformations-Polymorphismus-Analyse

Als weitere Methode wurde in dieser Arbeit die Einzelstrang-Konformations-Polymorphismus-Analyse (SSCP) eingesetzt, eine weitere Art der Gelelektrophorese, mit der sich kleinste Veränderungen einer DNA-Sequenz detektieren lassen (Orita et al., 1989). Das Verfahren basierte auf dem Prinzip, dass die elektrophoretische Beweglichkeit eines Moleküls in einer Gelmatrix von seiner Größe, Ladung und Form abhängt. Unter den gewählten nicht-denaturierenden, nativen Bedingungen nehmen einzelsträngige DNA-Fragmente eine sequenzspezifische Konformation ein. Diese Faltung basiert auf intramolekularen Basenpaarungen, die von der Sequenz vorgegeben werden. Es genügt ein einziger Unterschied in der Basensequenz, damit sich unterschiedliche Faltstrukturen in beiden Strängen ausbilden. Diese veränderte Konformation äußert sich in der Gelelektrophorese in anderen Laufeigenschaften (**Abb. 4.3**).

Die SSCP-Analyse wurde mit 8%-igen Polyacrylamidgelen, bestehend aus 10xTBE, Rotiphorese 40 (40%-ige Lösung aus Acrylamid und N,N'-Methylenbisacrylamid der Firma Roth), 87%-igen Glycerin (Merck), 1% Ammoniumpersulfat (APS der Firma Roth) und 0,1% N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED der Firma Amersham Biosciences), durchgeführt.

Abb. 4.3: Schematischer Überblick über die Technik der SSCP-Analyse.



Die 25  $\mu\text{l}$  PCR-Ansätze wurden mit 20  $\mu\text{l}$  denaturierendem Probenpuffer (95% Formamid, 10 mM Natriumhydroxid, 0,025% Bromphenolblau, 0,025% Xylencyanol) versetzt und bei 95 °C für 5 Minuten denaturiert. Anschließend wurden die Proben sofort auf Eis gestellt und im Kühlraum bei 4 °C in die Kammern des Maxi-Polyacrylamidgels 17x18 cm (Biometra) pipettiert. Als Laufpuffer wurde 1xTBE verwendet. Die jeweilige Laufzeit und angelegte Spannung, die in Vorversuchen die besten Ergebnisse erbracht hatten, wurden für jedes PCR-Produkt individuell bestimmt. Zur Markierung der Banden nach Beendigung der Elektrophorese wurden die Gele für 2 Minuten in eine 1%-ige wässrige Ethidiumbromidlösung gelegt und danach für weitere 2 Minuten in einem Wasserbad geschwenkt. Die Auswertung erfolgte im ultravio-

letten Licht einer Chemi-Doc-Dokumentationskammer mit dem Softwareprogramm Quantity-One.

#### **4.4 Reinigung von PCR-Produkten für die Sequenzierung**

Um ein auswertbares Sequenzierungsergebnis zu erhalten, musste das PCR-Produkt vor der Sequenzierung von Kontaminationen gereinigt werden. Dazu wurden 5 µl der DNA-Probe mit 2 µl Exo/SAP (5-Prime) versetzt und das Gemisch für 15 Minuten bei 37 °C inkubiert. Unter diesen Bedingungen wurde Exo/SAP aktiviert und das PCR-Produkt gereinigt. Das Exo/SAP bestand aus zwei hydrolytischen Enzymen, einer Exonuklease I und einer alkalischen Phosphatase, die in einer speziellen Pufferlösung gelöst sind und für die Reinigung der DNA benutzt werden. Die Exonuklease I entfernte vor allem die überflüssigen Primer, die während der PCR nicht verwertet wurden, aber auch DNA-Artefakte, die während der PCR entstanden sind. Die alkalische Phosphatase beseitigte hingegen die übrig gebliebenen dNTP's aus der DNA-Probe, die die Qualität des Sequenzierungsergebnisses herabsetzen könnten. Zur Inaktivierung der beiden Enzyme wurde das Gemisch abschließend für 15 Minuten bei 80°C inkubiert. Die Proben konnten im Anschluss sofort weiter verarbeitet werden.

#### **4.5 DNA-Sequenzierung**

Alle in dieser Arbeit durchgeführten Sequenzierungen wurden von der Firma Seqlab-Sequence-Laboratories in Göttingen durchgeführt. Dafür musste die zu sequenzierende, zuvor gereinigte Patienten-DNA mit 20 pmol Sequenzierprimer vermischt und in ein 200 µl Reaktionsgefäß (Eppendorf) gegeben werden.

Unter DNA-Sequenzierung versteht man die Bestimmung der Nukleotid-Abfolge in einem DNA-Molekül. Es wurden zwei Sequenziertechniken entwickelt, die von Maxam und Gilbert im Jahre 1977 bzw. von Sanger und Coulson 1975 erarbeitet wurden und sich in ihrer Durchführung grundlegend unterscheiden. Weil sich die Methode nach Sanger aufgrund der besseren

Praktikabilität im Laboralltag durchgesetzt hat und in modifizierter Form auch in dieser Studie verwandt wurde, kam im Weiteren nur diese Methode zum Einsatz.

Die DNA-Sequenzierung nach Sanger wird auch Didesoxymethode genannt und basiert auf dem Prinzip des Kettenabbruchs. Zu Beginn der Sequenzierung lag die amplifizierte DNA im Allgemeinen als linearer Doppelstrang vor. Um die DNA-Stränge voneinander zu trennen, wurde die DNA für einige Minuten bei 95°C erhitzt und danach sofort schockartig auf Eis abgekühlt. Damit wurde verhindert, dass sich die denaturierte DNA erneut zu einem Doppelstrang ausbildet. Alle Ansätze enthielten die vier natürlich vorkommenden dNTP's, eine Polymerase und einen Sequenzierprimer. Schließlich enthielt jeder Reaktionsansatz je einen der vier modifizierten Didesoxynukleosid-Triphosphate (ddNTP's). Diese modifizierten ddNTP's besitzen im Gegensatz zu den dNTP's keine 3'Hydroxygruppe und führen beim Einbau in den neu-synthetisierten Strang durch die Polymerase zum Kettenabbruch. In den Reaktionsansätzen befanden sich dNTP's und ddNTP's in einem bestimmten Verhältnis zueinander, um zu gewährleisten, dass an jeder Basenposition eine später detektierbare Fraktion der Moleküle durch den Einbau eines ddNTP's terminiert wurde. Die größere Fraktion der Moleküle wurde durch den Einbau von dNTP's hingegen lediglich verlängert. Die ddNTP's waren mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markiert und konnten so, nach elektrophoretischer Auftrennung in einer Gelmatrix, aufgrund der unterschiedlichen spektralen Eigenschaften der Farbstoffe detektiert werden. Ein spezielles Computerprogramm errechnete aus der Wellenlänge der detektierten Signale jeweils die eingebaute Base, so dass letztendlich ein Sequenzmuster erhalten wurde, das eine zur sequenzierten Matrize komplementäre Basenabfolge zeigte. Diese Basenabfolge ließ sich graphisch in Form eines Chromatogramms darstellen und computergestützt auswerten.

## 5 Ergebnisse

### 5.1 Patientenkollektiv

Das in der vorliegenden Arbeit untersuchte Patientenkollektiv bestand aus 161 Patienten im Alter von 28-82 Jahren, die im Rahmen eines DCM-Projektes der Philipps-Universität Marburg in das Kompetenznetz Herzinsuffizienz aufgenommen wurden. Von den 161 Personen waren 113 männlichen und 48 weiblichen Geschlechts. Bei allen Patienten wurde die Erkrankung sowohl echokardiographisch als auch mittels Herzkatheter untersucht und bestätigt. Aufgrund der umfassenden Diagnostik, der Auswertung von Fragebögen und Stammbäumen zur Familiengeschichte sowie der Untersuchung von Myokardbiopsien konnten die zugrunde liegenden Ätiologien der Erkrankungen zudem weitgehend erfasst werden. Weitere Angaben und diagnostische Werte des Patientenkollektivs sind der **Tabelle 5.1** zu entnehmen.

**Tab. 5.1: Klinische Daten des untersuchten Patientenkollektivs.**

	Geschlecht männlich	Alter bei Diagnose- stellung (Jahre)	NYHA (Stadium)	EF (%)	LVEDD (mm)	IVSd (mm)	Klinik AP
<b>Gesamtkohorte (n=161)</b>	70%	54 ± 21	II-III	34 ± 15	66 ± 9	10 ± 1,7	19%
<b>Patienten mit idiopathischer DCM (n=127)</b>	72%	55 ± 20	II-III	34 ± 15	66 ± 9	10 ± 1,65	18%
<b>Patienten mit familiärer DCM (n=34)</b>	65%	48 ± 28	III	31 ± 14	67 ± 8	10 ± 2,0	21%

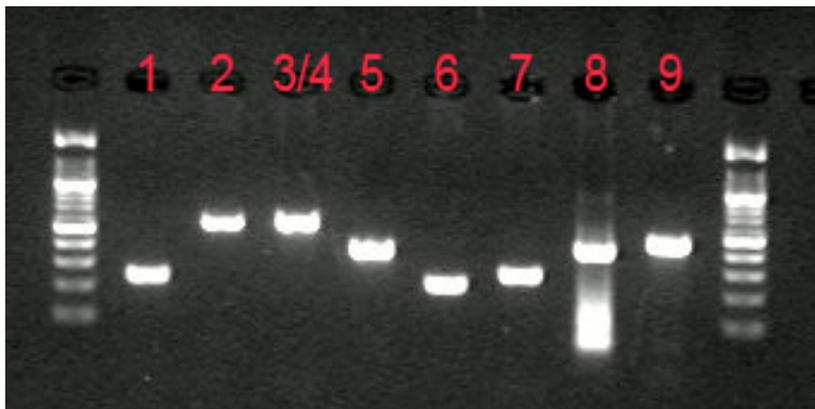
Angaben der arithmetischen Mittelwerte und Standardabweichungen;

NYHA-Stadium=Stadieneinteilung der Herzinsuffizienz nach der New York Heart Association; EF=Ejektionsfraktion in %; AP=Angina pectoris; LVEDD=linksventrikulärer enddiastolischer Durchmesser in mm; IVSd=interventrikuläre Septumdicke in der Diastole in mm.

## 5.2 Durchführung des Mutationsscreenings

Im Rahmen der vorliegenden klinischen Studie wurde bei insgesamt 161 Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie eine systematische Mutationssuche im Gen des kardialen Ankyrin-Repeat-Proteins durchgeführt. Zu diesem Zweck wurde aus Blutproben der Patienten zunächst die genomische DNA extrahiert und im Anschluss daran die einzelnen Exons mittels PCR amplifiziert (**Abb. 5.1.1**). Mit den entstandenen Amplifikaten wurde anschließend eine Einzelstrang-Konformations-Polymorphismus-Analyse (SSCP) durchgeführt (**Abb. 5.1.2** und **5.1.3**). Im Falle einer Abweichung des Laufmusters wurde das PCR-Produkt aufgereinigt und in den Seqlab-Sequence-Laboratories (Göttingen) mittels modifizierter Didesoxymethode sequenziert.

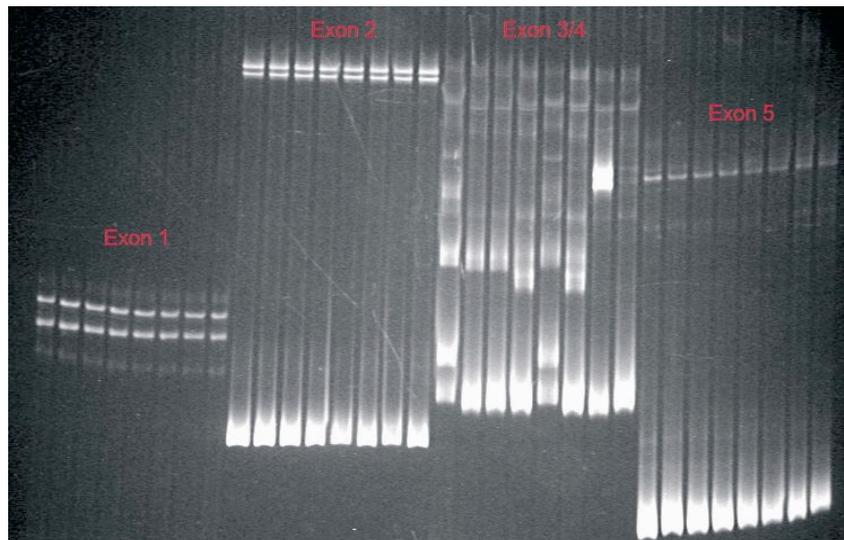
**Abb. 5.1.1:** Darstellung aller PCR-Amplifikate, die für die neun Exons im Gen des kardialen Ankyrin-Repeat-Proteins kodieren.



Reihenfolge der Bahnen von links nach rechts (siehe rote Zahlen):  
100bp-Marker, Exon1, Ex.2, Ex.3/4, Ex.5, Ex.6., Ex.7, Ex.8, Ex.9,  
100bp-Marker.

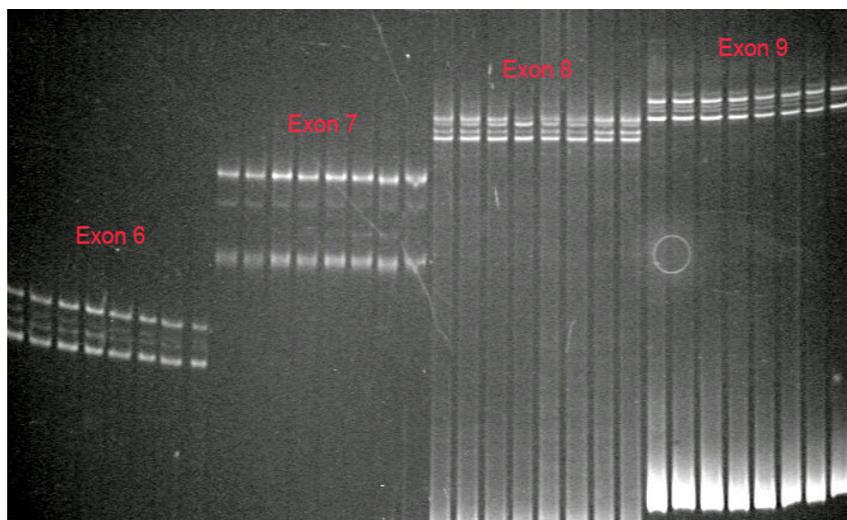
Um die Sensitivität der Analyse zu erhöhen, wurden die PCR-Produkte, die unter der ersten SSCP-Bedingung nicht optimal aufgetrennt wurden, erneut bei weiteren Elektrophoresebedingungen untersucht (**Tab. 5.2**). Zudem wurden, sofern vorhanden, Positiv-Kontrollen mit bekannten Mutationen zusammen mit den zu untersuchenden Exons auf den SSCP-Gelen aufgetrennt. Alle SSCP-Analysen wurden bei einer Temperatur von 4°C unter Verwendung von 8%-igen Polyacrylamidgelen durchgeführt.

**Abb. 5.1.2: Gelelektrophoretische Auftrennung von jeweils 8 Proben der Exone 1, 2, 3/4 und 5 mittels SSCP-Analyse.**



SSCP-Bedingungen: 8%iges Polyacrylamidgel, Laufzeit: 4h bei 300V.

**Abb. 5.1.3: Gelelektrophoretische Auftrennung von jeweils 8 Proben der Exone 6, 7, 8 und 9 mittels SSCP-Analyse.**



SSCP-Bedingungen: 8%iges Polyacrylamidgel, Laufzeit: 4h bei 300V.

Um die Möglichkeit eines Krankheits-spezifischen Vorkommens des neu identifizierten Polymorphismus im Exon 1 untersuchen zu können, wurden außerdem 202 gesunde Kontrollen unter den gleichen Elektrophoresebedingungen analysiert.

Tab. 5.2: Elektrophoresebedingungen aller neun Exons des ANKRD1-Gens.

	1. SSCP-Bedingung	2. SSCP-Bedingung
<b>Exon 1</b>	Laufzeit: 5 Min. bei 500 V 4 h bei 300 V	---
<b>Exon 2</b>	Laufzeit: 5 Min. bei 500 V 4 h bei 300 V	---
<b>Exon 3/4</b>	Laufzeit: 5 Min. bei 500 V 4 h bei 300 V	Laufzeit: 5 Min. bei 500 V 10 h bei 100 V
<b>Exon 5</b>	Laufzeit: 5 Min. bei 500 V 4 h bei 300 V	Laufzeit: 5 Min. bei 500 V 3 h bei 300 V
<b>Exon 6</b>	Laufzeit: 5 Min. bei 500 V 4 h bei 300 V	Laufzeit: 5 Min. bei 500 V 7 h bei 200 V
<b>Exon 7</b>	Laufzeit: 5 Min. bei 500 V 4 h bei 300 V	Laufzeit: 5 Min. bei 500 V 17 h bei 100 V
<b>Exon 8</b>	Laufzeit: 5 Min. bei 500 V 4 h bei 300 V	Laufzeit: 5 Min. bei 500 V 17 h bei 100 V
<b>Exon 9</b>	Laufzeit: 5 Min. bei 500 V 4 h bei 300 V	Laufzeit: 5 Min. bei 500 V 7 h bei 200 V

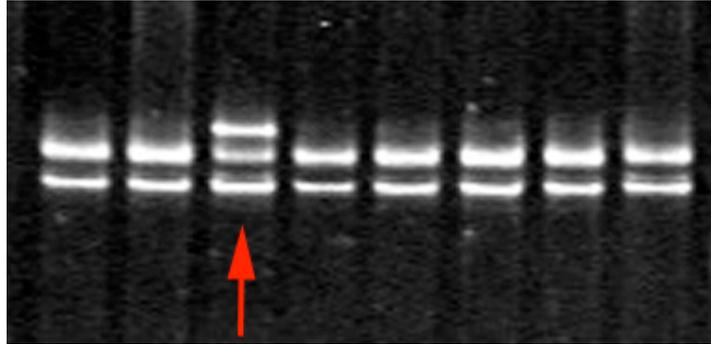
### 5.3 Nachweis einer stillen Mutation im Exon 2

Bei der SSCP-Analyse des Indexpatienten 162 zeigte sich eine Laufmusterabweichung im Exon 2 unter folgenden Elektrophoresebedingungen: Laufzeit: 5 Min. bei 500 V und 4 h bei 300 V bei einer Temperatur von 4°C (**Abb. 5.3.1**).

Die im Anschluss durchgeführte DNA-Sequenzierung wies eine Nukleotidsubstitution von Thymin zu Cytosin in der DNA-Position 1008 nach (**Abb. 5.3.2**). Dieser Basenaustausch ist jedoch an der dritten Stelle des für die Aminosäure Alanin kodierenden Triplets (GCT→GCC) lokalisiert, sodass diese Mutation zu keinem Aminosäureaustausch führt.

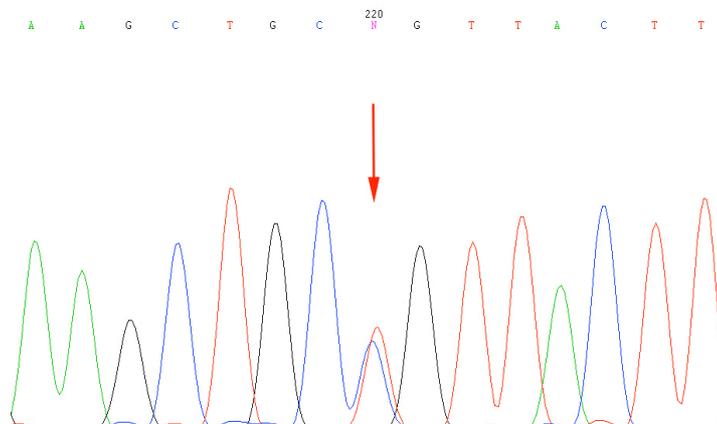
Der Träger der stillen Mutation ist männlich und wurde im Alter von 65 Jahren in das DCM-Projekt aufgenommen. Aufgrund der oben genannten umfassenden Diagnostik konnte bei ihm eine inflammatorische dilatative Kardiomyopathie (DCMi) diagnostiziert werden.

**Abb. 5.3.1: Ausschnitt einer SSCP-Analyse von Exon 2 des ANKRD1-Gens.**



Laufbandabweichung in Spur 3 des Indexpatienten 162 (roter Pfeil). Spuren 1,2,4,5,6,7,8 (v.l.n.r.) stellen PCR-Fragmente von Patienten mit Wildtypsequenz dar. Elektrophoresebedingungen: Laufzeit 4 h bei 300 V.

**Abb. 5.3.2: Sequenzausschnitt des Chromatogramms von Exon 2 des ANKRD1-Gens.**



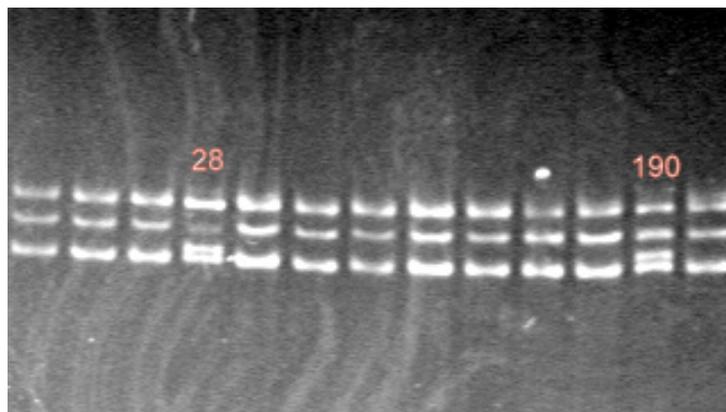
Der Pfeil kennzeichnet die heterozygote Nukleotidsubstitution (N) von Thymin zu Cytosin.

## 5.4 Detektion eines unbekanntes Polymorphismus im Exon 1

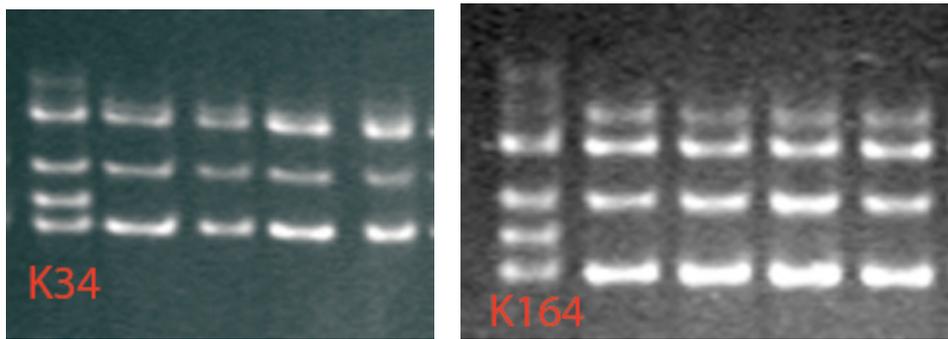
Dieser bisher unbekanntes Polymorphismus konnte durch eine Laufmusterabweichung in der SSCP-Analyse bei einer Temperatur von 4°C und einer Laufzeit von 4 h bei 300 V identifiziert werden (**Abb. 5.4.1** und **5.4.2**). Zur Bestätigung wurde auch hier eine DNA-Sequenzierung durchgeführt. Diese ergab eine C>T-Transition in DNA-Position 170 des Exon 1 (**Abb. 5.4.3**).

Bei diesem Polymorphismus handelt es sich um eine seltene Variante. Nur zwei Patienten (1,24%), Indexpatient 28 und 190, zeigten einen heterozygoten Genotyp für diese Variante. Um ein Krankheits-spezifisches Vorkommen dieses Polymorphismus festzustellen, wurden ebenfalls 202 gesunde Kontrollen auf den Polymorphismus untersucht. Auch in der Kontrollkohorte ließ sich der Polymorphismus unter den gleichen Elektrophoresebedingungen mittels SSCP-Analyse und im Anschluss durchgeführter DNA-Sequenzierung bei 2 von 202 Kontrollen (0,99%) identifizieren. Somit konnte ein Krankheits-spezifisches Vorkommen dieses Polymorphismus nicht bestätigt werden.

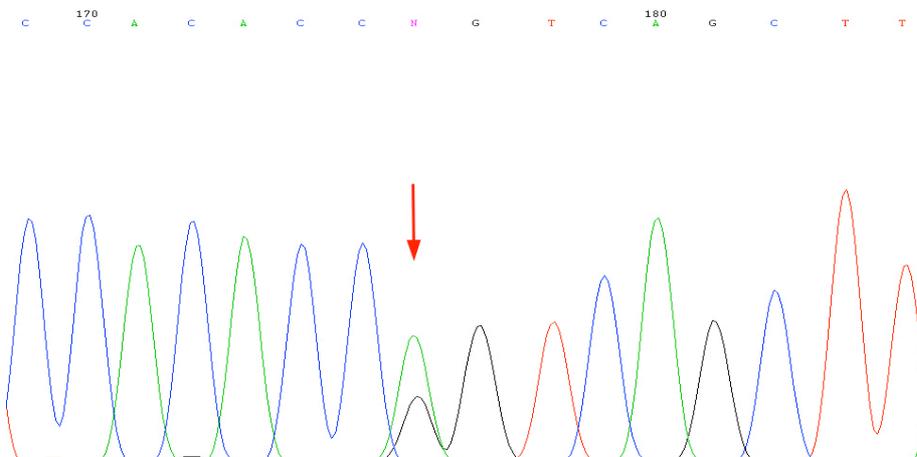
**Abb. 5.4.1: SSCP-Analyse von Exon 1 des ANKRD1-Gens bei DCM-Patienten.**



Abweichendes gelelektrophoretisches Laufverhalten in den Bahnen 4 und 12 bei den Indexpatienten 28 und 190. Spuren 1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 13 (v.l.n.r.) stellen PCR-Fragmente von Patienten mit Wildtypsequenzen dar. Elektrophoresebedingungen: Laufzeit 4 h bei 300 V.

**Abb. 5.4.2: SSCP-Analyse von Exon 1 des ANKRD1-Gens von Kontrollen.**

Gezeigt ist die gelelektrophoretische Auftrennung von PCR-Amplifikaten von Kontrollprobanden. Abweichendes Laufverhalten in Spur 1 (K34) der linken Abbildung, sowie in Spur 1 (K164) des rechten Bildausschnittes. Die restlichen Spuren stellen PCR-Fragmente von Kontrollen mit Wildtypsequenz dar. Elektrophoresebedingungen: Laufzeit 4h bei 300V.

**Abb. 5.4.3: Rückwärtssequenzierung von Exon 1 des ANKRD1-Gens mit Nachweis einer heterozygoten C>T-Transition in Nukleotid-Position 170.**

Der Pfeil kennzeichnet die Nukleotidsubstitution (N).

Beide Träger des Polymorphismus sind männlich und erkrankten im Alter von 63 bzw. 65 Jahren an DCM. Beim Indexpatienten 28 konnte eine familiäre DCM bestätigt werden. Der Vater des Patienten war ebenfalls erkrankt. Beim Indexpatienten 190 konnte auch nach umfangreicher Diagnostik eine Myokarditis als Differentialdiagnose nicht ausgeschlossen werden. Aufgrund dieser klinischen Daten ist ein Phänotyp-spezifisches Vorkommen des Polymorphismus ebenfalls unwahrscheinlich.

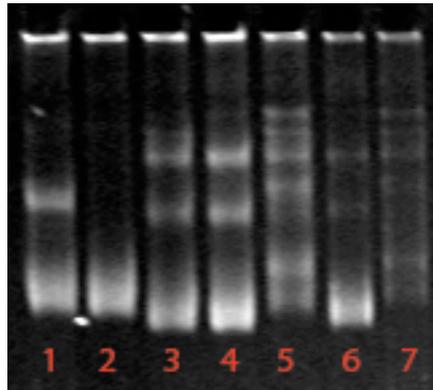
## 5.5 Identifizierung bekannter Polymorphismen im Exon 3/4

Die Exons 3 und 4 wurden mittels PCR zusammen amplifiziert und die Amplifikate anschließend mit der SSCP-Analyse aufgetrennt. Da das Intron 4 eine Adenin-Thymin-reiche Sequenz beinhaltet, stellte es sich als Schwierigkeit heraus, geeignete Primer für eine getrennte Amplifikation beider Exons zu erstellen. Zudem sind für die oben genannte Sequenz bereits mehrere Polymorphismen, vor allem Deletionen, beschrieben. Infolgedessen zeigte auch die SSCP-Analyse dieser Arbeit unterschiedliche Laufmuster der PCR-Produkte. Mit Hilfe von Positiv-Kontrollen und direkten Sequenzierungen auffälliger Proben gelang es jedoch die SSCP-Ergebnisse zuverlässig auszuwerten.

Bei 29 von 150 auswertbaren Patienten (19,33%) ließ sich eine Deletion von 21 Basenpaaren an der DNA-Position 2275 bis 2295 nachweisen (Abb. **5.5.1** und **5.5.2**). Das Ende der Deletion liegt nur 8 bp vom Exon 4 entfernt. Bei 5 von den 29 Patienten (Indexnummern: 176, 178, 179, 181, 183) wurde eine Sequenzierung durchgeführt, mit der zusätzlich ein bekannter Polymorphismus identifiziert werden konnte (Data-Base-Nr.: rs56177217). Es handelt sich hierbei um eine Nukleotidtransition von Thymin zu Cytosin an der DNA-Position 2268 (**Abb. 5.5.3**). Da die Proben aller Indexpatienten mit der 21bp-Deletion das gleiche Laufmuster zeigten, kann mit großer Wahrscheinlichkeit davon ausgegangen werden, dass auch die restlichen Indexpatienten die T>C-Transition aufweisen.

Bei 72 von 150 auswertbaren Patienten (48%) konnte zudem eine Deletion von 16 bp und bei 28 von 150 Patienten (18,67%) eine 26 bp-Deletion nachgewiesen werden. Beide Deletionen sind ebenfalls in der TA-reichen Region des Intron 4 lokalisiert und bereits bekannt.

**Abb. 5.5.1: SSCP-Analyse von Exon 3/4 des ANKRD1-Gens.**



Darstellung der drei identifizierten

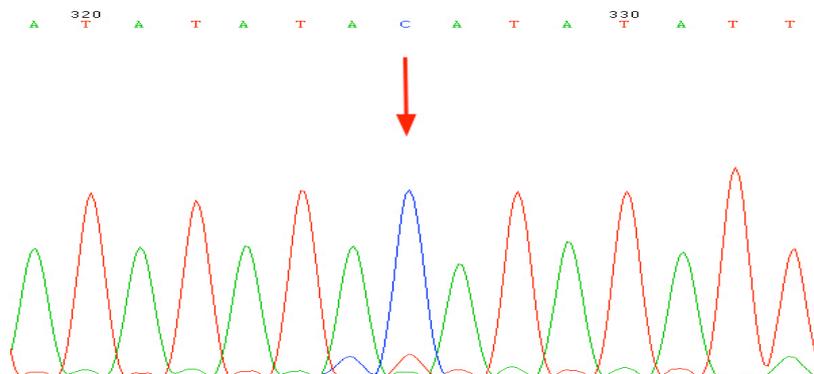
Deletionen:

16 bp Deletion: Spur 1,2;

21 bp Deletion: Spur 3, 4, 6

26 bp Deletion: Spur 5, 7.

**Abb. 5.5.2: Ergebnis der Sequenzierung von Exon 3/4 des ANKRD1-Gens.**

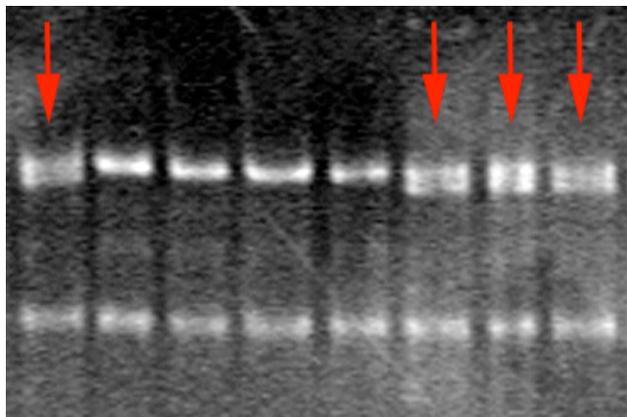


Der Pfeil kennzeichnet die Nukleotidsubstitution von Thymin zu Cytosin.

## 5.6 Identifikation eines Polymorphismus im Intron 7

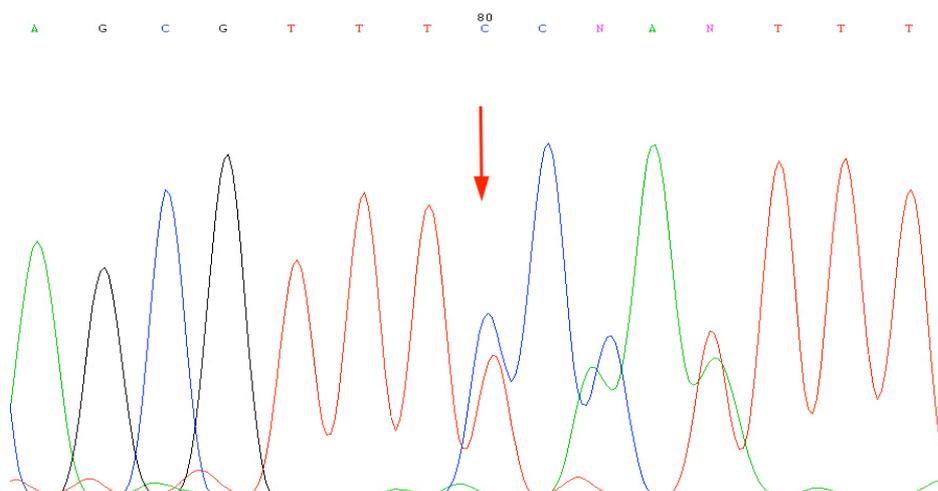
Dieser bereits bekannte Polymorphismus wurde durch eine Laufmusterabweichung in der SSCP-Analyse bei 100 V über 17 h erkannt (**Abb. 5.6.1** und **5.6.2**). Bei dem Polymorphismus handelt es sich um eine Deletion von Thymin an Stelle 5383 der DNA (Data-Base-Nr.: rs3839939). Die Deletion konnte mit Hilfe der SSCP-Analyse bei 35 von 156 untersuchten Patienten (22,4%) nachgewiesen werden.

**Abb. 5.6.1: SSCP-Analyse von Exon 7 des ANKRD1-Gens.**



Die Deletion wird durch eine Laufmusterabweichung in Form einer Doppelbande sichtbar (rote Pfeile).  
Elektrophoresebedingungen: Laufzeit 17 h bei 100 V.

**Abb. 5.6.2: Sequenzierergebnis von Exon 7 des ANKRD1-Gens.**

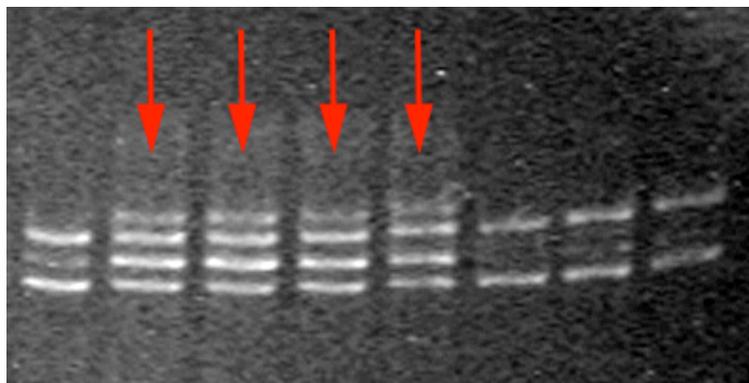


Der Pfeil kennzeichnet die Nukleotiddeletion von Thymin.

## 5.7 Nachweis eines Polymorphismus im Intron 9

Die Transition der Purinbase Adenin zu Guanin an Stelle 8469 der DNA liegt im untranslatierten Bereich, 59 Basenpaare vom Exon 9 entfernt. Dieser Polymorphismus ist ebenfalls bekannt (Data-Base-Nr.: rs3939) und konnte durch eine Laufmusterabweichung mit der SSCP-Analyse identifiziert werden (**Abb. 5.7.1** und **5.7.2**). Insgesamt wurde die Transition bei 70 von 155 (45,2%) auswertbaren Proben des zu untersuchenden Patientenkollektivs gefunden.

**Abb. 5.7.1: SSCP-Analyse von Exon 9 des ANKRD1-Gen.**

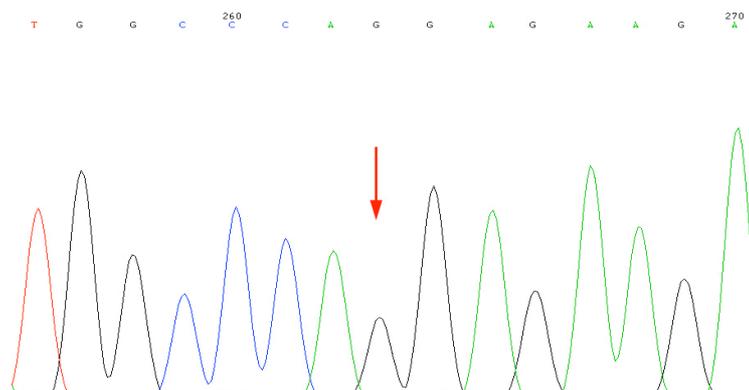


Die Transition wird durch eine Laufmusterabweichung in Form einer Viererbande sichtbar (rote Pfeile).

Spur 1, 6, 7 und 8 stellen PCR-Fragmente von Patienten mit Wildtypsequenz dar.

Elektrophoresebedingungen: Laufzeit 4h bei 300V.

**Abb. 5.7.2: Sequenzausschnitt des Chromatogramms von Exon 9 des ANKRD1-Gen.**



Der Pfeil kennzeichnet die Transition von Adenin zu Guanin.

## 5.8 Fehlende Variationen in den Exons des ANKRD1-Gens

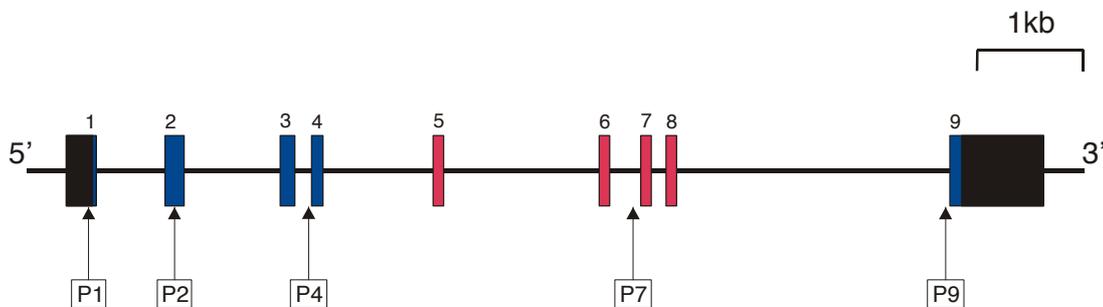
Die Exons 5, 6 und 8 ließen sich mit den erstellten Primer sauber amplifizieren und wurden jeweils unter zwei unterschiedlichen Elektrophoresebedingungen mit der SSCP-Analyse auf Variationen untersucht (**Tab. 5.1**). Bei der Auswertung der SSCP-Analysen aller oben beschriebenen Exons konnten allerdings keine Laufmusterabweichungen gefunden werden.

## 5.9 Zusammenfassung der Ergebnisse

Insgesamt konnten eine stille Mutation im Exon 2 des ANKRD1-Gens sowie ein bisher unbekannter Polymorphismus im Exon 1 identifiziert werden. Zusätzlich wurden die bereits publizierten Polymorphismen in den Exons 3/4, 7 und 9 gefunden.

In **Tabelle 5.9** und **Abbildung 5.9** sind alle Ergebnisse der genetischen Analyse zusammengefasst.

**Abb. 5.9:** Darstellung der Ergebnisse in der Genstruktur des ANKRD1-Gens.



Die Graphik stellt die Lokalisationen der in dieser Arbeit gefundenen Mutationen und Polymorphismen in der Genstruktur des ANKRD1-Gens dar (siehe auch Tab. 5.9):

P1= SNP Exon 1 170 C>T, P2= stille Mutation A36A im Exon 2, 1008 T>C, P4= Deletionen (16bp, 21bp, 26bp) im Intron 4 sowie bekannter Polymorphismus rs56177217, P7= Polymorphismus im Intron 7 (rs3839939), P9= Polymorphismus im Intron 9 (rs3939).

Tab. 5.9: Zusammenfassung der Ergebnisse.

<b>Mutation/ SNP</b>	<b>Anzahl</b>	<b>Exon/ Intron</b>	<b>Nukleotid- austausch</b>	<b>Aminosäuren- austausch</b>	<b>neu oder bekannt</b>
Mutation	1	Exon 2	1008 T>C	A36A	neu
SNP	2	Exon 1	170 C>T	---	neu
SNP	29	Intron 4	2268 T>C	---	bekannt (rs56177217)
SNP	72	Intron 4	del 16 bp	---	bekannt
SNP	29	Intron 4	del 21 bp	---	bekannt
SNP	28	Intron 4	del 26 bp	---	bekannt
SNP	35	Intron 7	5383 T>-	---	bekannt (rs3839939)
SNP	70	Intron 9	8469 A>G	---	bekannt (rs3939)

## 6 Diskussion

### 6.1 Identifizierung von Mutationen im ANKRD1-Gen bei Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie

Das Ziel dieser Arbeit bestand in der Untersuchung von Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie auf mögliche krankheitsassoziierte Mutationen im ANKRD1-Gen. Im Rahmen eines Mutationsscreenings wurden alle neun Exons des ANKRD1-Gens von insgesamt 161 Indexpatienten mit DCM analysiert. Eine stille Mutation, ein nicht bekannter Polymorphismus und sechs bekannte Polymorphismen in den Exons 3/4, 7 und 9 konnten identifiziert werden.

Die Suche nach Mutationen und Polymorphismen wurde mit Hilfe der Einzelstrang-Konformations-Polymorphismus-Analyse (SSCP-Analyse) durchgeführt. Bei dieser Methode werden die PCR-Fragmente durch Hitze denaturiert und die einzelsträngigen DNA-Fragmente anschließend unter nicht-denaturierenden Bedingungen elektrophoretisch aufgetrennt. Die SSCP-Technik ist eine schon seit langer Zeit angewandte Methode, um eine große Anzahl von Proben auf Mutationen zu untersuchen. Voraussetzung für das Gelingen einer SSCP-Analyse ist die Optimierung der PCR-Bedingungen und der Konditionen, unter denen die Analyse vorgenommen wird. Alle für diese Arbeit durchgeführten SSCP-Analysen wurden mit 8%-igen Polyacrylamidgelen unter Zusatz von Glycerin (2,5%) bei einer Temperatur von 4 °C durchgeführt. Die Sensitivität der Methode ist abhängig von der Länge der aufzutrennenden DNA-Fragmente. Bei einer Produktlänge von 100-300 bp sind Laufmusterabweichungen unter optimalen Elektrophoresebedingungen bis zu 97% detektierbar. Bei Fragmentlängen über 300 bp nimmt die Empfindlichkeit ab (Hayashi, 1991; Konstantinos et al., 2008). Um die Sensitivität der Analyse für die vorliegende Arbeit zu optimieren, wurden die PCR-Produkte aller Exons, bis auf Exon 1 und 2, unter zwei verschiedenen Elektrophoresebedingungen untersucht. Die DNA-Fragmente von Exon 1 und 2 wurden nur unter einer Elektrophoresebedingung aufgetrennt, weil bereits unter der ersten Bedingung eine optimale Auftrennung beider Exons erreicht und Laufmusterabweichungen detektiert werden konnten. Weitere

Modifikationen der Laufzeit und Temperatur zeigten bei beiden Exons keine besseren Ergebnisse. Zudem wurden, sofern vorhanden, Positiv-Kontrollen mit bekannten Mutationen zusammen mit den zu untersuchenden Exons auf den SSCP-Gelen aufgetrennt. Im Falle einer Laufmusterabweichung wurden die PCR-Produkte aufgereinigt und sequenziert.

Die Sequenzierung stellt aufgrund der optischen Darstellung des Sequenzierergebnisses die sensitivste Methode zum Nachweis von Mutationen dar. Um Mutationen bestätigen und lokalisieren zu können, war die Anwendung dieses Verfahren für diese Arbeit unerlässlich. Fehler sind jedoch auch bei dieser Methode möglich. So ist eine sorgfältige Probenaufbereitung vor der Sequenzierung unabdingbar, da ansonsten keine zuverlässigen Auswertungen möglich sind. Zudem gibt es DNA-Fragmente, die sich aufgrund der Basenpaarabfolge oder vorliegender Polymorphismen schlecht sequenzieren lassen. Letztendlich benötigt es für die Deutung der SSCP-Ergebnisse als auch für die Auswertung der Chromatogramme eine gewisse Übung und Erfahrung. Vorteile der SSCP-Analyse gegenüber der automatischen Sequenzierung bestehen vor allem in dem geringeren Zeitaufwand und den niedrigeren Kosten. Die Vorbereitungszeit, die für jede einzelne Probe nötig ist, unterscheidet sich bei beiden Methoden kaum. Relevant ist dagegen der Zeitaufwand für die Auswertung der Ergebnisse. So lassen sich bei einem SSCP-Durchlauf 64 Patientenproben auf zwei Gele auftragen und anschließend im ultravioletten Licht der Dokumentationskammer auswerten.

Unter optimalen Elektrophoresebedingungen sind Laufmusterabweichungen gut zu erkennen. Somit müssen im Anschluss der SSCP-Analyse nur die auffälligen Proben sequenziert werden. Angesichts der relativ geringen Prozentzahl gefundener Mutationen ist der Zeitaufwand insgesamt geringer, als für das komplette Sequenzieren des gesamten Patientenkollektivs. Zudem sollte der wirtschaftliche Gesichtspunkt bei der Auswahl der geeigneten Methode nicht vernachlässigt werden. Für die Sequenzierungen ist neben den teuren Materialkosten auch die Bereitstellung eines Sequenzierautomaten notwendig, dessen Anschaffungskosten die für eine Elektrophoresekammer um ein Vielfaches übersteigen. Des Weiteren können die für ein SSCP benötigten Reagentien einzeln gekauft und somit auf günstigere Produkte verschiedener Firmen zurückgegriffen werden. Somit kostet eine SSCP-Analyse, mit

der 64 Patientenproben gleichzeitig untersucht werden können, nur ein Bruchteil der Sequenzierung für eine gleichgroße Patientenprobe.

Zusammenfassend lässt sich deshalb sagen, dass die SSCP-Analyse, aufgrund der Kosten- und Zeitersparnis die optimale Methode für die Untersuchung eines größeren Patientenkollektivs darstellt, die eine ausreichende Sensitivität in der Analyse von Laufveränderungen bietet.

## 6.2 ANKRD1 als Kandidatengen

In der vorliegenden Arbeit konnten bei den 161 untersuchten DCM-Patienten insgesamt eine stille Mutation sowie ein bisher unbekannter und sechs bekannte Polymorphismen identifiziert werden. Im Exon 2 des ANKRD1-Gens ließ sich eine Nukleotidsubstitution von Thymin zu Cytosin in DNA- Position 1008 nachweisen. Dieser Basenaustausch ist jedoch an der dritten Stelle des für die Aminosäure Alanin kodierenden Triplets ( $GCT \rightarrow GCC$ ) lokalisiert, so dass diese Mutation zu keinem Aminosäureaustausch führt. Bei diesem Triplett, das für die gleiche Aminosäure kodiert, handelt es sich um ein synonymes Codon. Aufgrund der Degeneration des genetischen Codes wird der Einbau einer bestimmten Aminosäure durch mehrere, verschiedene Triplets kodiert, die sich lediglich in ihrer letzten Base unterscheiden. Eine stille Mutation ist somit eine Mutation, bei der sich ein Codon zwar verändert, jedoch keinen Effekt auf die Aminosäureabfolge hat. Lange Zeit wurden stille Mutationen als bedeutungslos eingestuft. Neuere Erkenntnisse zeigen jedoch, dass auch stille Mutationen Auswirkungen auf die Translationseffizienz von Proteinen haben und somit an der Pathogenese von Erkrankungen beteiligt sein können. Ein Beispiel dafür ist die Mukoviszidose, für die mehr als 70 stille Mutationen beschrieben sind (Schrijver et al. 2008; Bobadilla et al., 2002).

Der Gebrauch synonymer Codons scheint nicht zufällig zu sein. Die Verwendung synonymer Codons könnte einen Selektionsvorteil darstellen, der sich durch eine veränderte Proteinsyntheserate erklären lässt. Im Falle eines Selektionsvorteils durch die Verwendung eines bestimmten Codons kann davon ausgegangen werden, dass dieses beim Menschen häufiger zur Kodierung

der entsprechenden Aminosäure verwendet wird (Grantham et al., 1980; Sharp und Li, 1986; Bulmer, 1988). In diesem Kontext zeigten Zhang und Kollegen erst kürzlich, dass die DNA-Sequenz und die Auswahl verschiedener Codons für eine Aminosäure die Kinetik des posttranslationalen Faltungsprozesses von Proteinen dirigiert (Zhang et al, 2008). Die Translation ist ein wesentlich schnellerer Prozess, als die darauf folgende Faltung der neu gebildeten Proteinkette. Beide Prozesse müssen synchronisiert werden. Die Arbeitsgruppe zeigte allerdings, dass die Geschwindigkeit, mit der unterschiedliche Codons zur selben Aminosäure übersetzt werden, stark variieren kann. Stille Mutationen können so Änderungen in der Translationskinetik verursachen, was zur Fehlfaltung von Proteinen und möglicherweise dessen funktionellem Verlust führen kann (Zhang et al., 2008). Ob die in der vorliegenden Arbeit identifizierte, stille Mutation einen Einfluss auf die Entstehung einer DCM hat bleibt unklar. Um mögliche Auswirkungen der Nukleotidsubstitution auf die funktionale Integrität bzw. die Proteinexpression des CARP zu prüfen, müssten weitere funktionelle Versuche mit der Mutante durchgeführt werden.

Als Polymorphismen werden Sequenzvariationen in den Genen einer Population bezeichnet. Definitionsgemäß muss die Auftretenshäufigkeit der Genvariante größer als ein Prozent sein, andernfalls wird von einer Mutation gesprochen. Im Rahmen dieser klinisch-epidemiologischen Studie wurden sieben Polymorphismen identifiziert. Bei sechs Polymorphismen handelt es sich um bereits bekannte Varianten. Der bisher unbekannte Polymorphismus wurde im Exon 1 in DNA-Position 170 identifiziert und trat mit einer Häufigkeit von 1,24% im untersuchten Patientenkollektiv auf. Um zu klären, ob diese Variante gehäuft bei DCM-Patienten auftritt, wurden zudem 202 gesunde Kontrollen auf diesen Polymorphismus untersucht. In der Kontrollgruppe ließ sich die Nukleotid-Transition ebenfalls in 0,99% der Fälle nachweisen. Aufgrund der nicht signifikant abweichenden Allelfrequenz des neu identifizierten Polymorphismus kann mit großer Wahrscheinlichkeit davon ausgegangen werden, dass dieser keine krankheitsverursachende Rolle bei der Pathogenese einer DCM einnimmt.

Für die bekannten Polymorphismen ist die Auftretenshäufigkeit in verschiedenen, ethnischen Gruppen teilweise bekannt. Aktuell ist für keine der Vari-

anten eine Modifizierung im Rahmen der Entstehung einer DCM beschrieben.

Für den Polymorphismus im Intron 9 (Data-Base-Nr.: 3939) ist eine Häufigkeit der Allelfrequenz von 50% bei Europäern veröffentlicht worden. Diese Verteilung kann die vorliegende Arbeit bestätigen. Bei 45,2% des Patientenkollektivs konnte der Polymorphismus ebenfalls nachgewiesen werden. Es besteht kein signifikanter Unterschied in der Allelverteilung zwischen Patienten und Kontrollen. Infolgedessen ist eine Assoziation mit der Pathogenese einer DCM unwahrscheinlich.

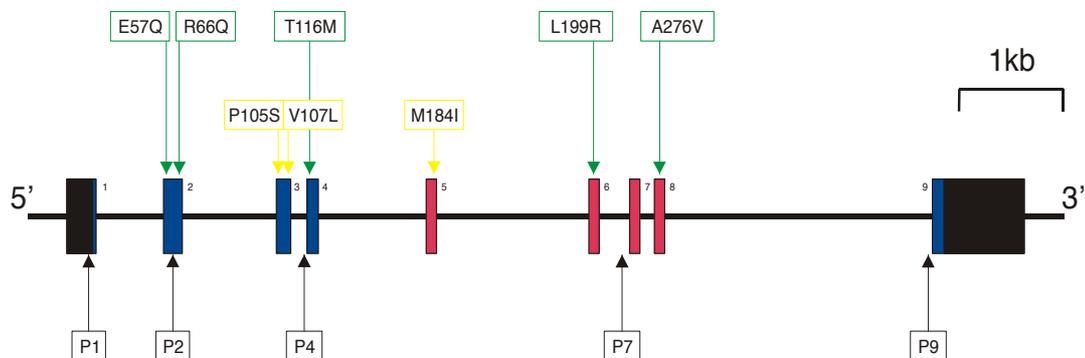
Die Allelfrequenz der Transition im Intron 7 (Data-Base-Nr.: rs3839939) ist bei Gesunden aufgrund fehlender Datenlage aktuell noch nicht bekannt. Um Unterschiede in der Allelfrequenz des Polymorphismus bei DCM-Patienten versus Gesunden erfassen zu können, müssten daher Kontrollkohorten auf den Polymorphismus untersucht werden. In dem untersuchten Patientenkollektiv dieser Arbeit konnte der Polymorphismus bei 22,4% der Indexpatienten nachgewiesen werden. Im Falle eines signifikanten Unterschiedes in der Häufigkeit des Vorkommens dieses Polymorphismus bei Gesunden und DCM-Patienten könnte eine mögliche Rolle der Transition für die Pathogenese der DCM diskutiert werden.

Auch für die im Intron 4 lokalisierten Polymorphismen existieren derzeit noch keine Auftretenshäufigkeiten bei Gesunden. Interessanterweise liegen aber alle identifizierten Varianten nur wenige Basenpaare vom Exon 4 entfernt. Weitere und umfangreichere Untersuchungen der Sequenzvariationen sind also auch in diesem Fall notwendig, um mögliche Auswirkungen auf die Funktion des Proteins aufdecken zu können.

Das in dieser Arbeit untersuchte ANKRD1-Gen, das für das Cardiac-Ankyrin-Repeat-Protein kodiert, wurde erst 2009 als neues Krankheitsgen fast zeitgleich sowohl von Moulik et al. als auch von Duboscq-Bidot et al. identifiziert. Durchgeführte Mutationsuntersuchungen des ANKRD1-Gens beider Arbeitsgruppen zeigten mit circa 2% eine relativ hohe Auftretenshäufigkeit von DCM-verursachenden Mutationen im ANKRD1-Gen. Diese Mutationshäufigkeit kann diese Arbeit nicht bestätigen.

Sowohl Moulik et al. als auch Duboscq-Bidot et al. untersuchten das ANKRD1-Gen mittels direkter Sequenzierung oder Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) auf Mutationen in Patientenkollektiven, die sowohl familiäre, als auch idiopathische DCM-Fälle einschlossen. Moulik und Kollegen gelang mit ihrem Mutationsscreening erstmals der Nachweis von drei heterozygoten Missense-Mutationen im ANKRD1-Gen bei 4 von 208 (1,9%) der untersuchten Patienten (**Abb. 6.2**). Keine der Varianten konnte in 180 gesunden Kontrollen nachgewiesen werden. Zwei der Mutationen, P105S und V107L, liegen im Exon 3 zwischen dem Nukleären-Lokalisations-Signal und der PEST-Region. M184I hat seine Lokalisation im zweiten Ankyrin-Repeat, in dem auch die Titin-N2A-Bindestelle des CARP gelegen ist. Folglich sind alle drei Missense-Mutationen in evolutionär hoch-konservierten Regionen des ANKRD1-Gens lokalisiert. Weitere funktionale Untersuchungen der Mutanten zeigten eine ausbleibende Protein-Protein-Interaktion mit Talin-1 und der 4-and-a-half-LIM-Domäne (FHL2). Talin-1 ist ein im  $\beta$ -Integrin-Protein-Komplex lokalisiertes Adapterprotein, das die extrazelluläre Matrix mit dem intrazellulären Zytoskelett verbindet. FHL2 ist ein Transkriptions-Cofaktor und liegt ebenfalls im  $\beta$ -Integrin-Protein-Komplex vor. Beide Proteine sind am Stretch-Sensing des Herzmuskels beteiligt. Da das Stretch-Sensing einen unverzichtbaren Bestandteil für die funktionale Integrität von Kardiomyozyten darstellt, könnte die fehlende Interaktion der Proteine möglicherweise in der Entstehung einer DCM resultieren. Außerdem konnte die Arbeitsgruppe eine veränderte Stress-induzierte Genexpression nach Wildtyp- und Mutanten-Expression nachweisen. Die Signifikanz dieses Ergebnis, als auch die Auswirkungen auf die Pathogenese der DCM, müssen durch weitere Versuche aber erst noch bestätigt werden.

**Abb. 6.2: Darstellung der vorbekannten und eigenen Ergebnisse der Mutationsanalysen für das ANKRD1-Gen.**



Darstellung der Struktur des ANKRD1-Gens. Die Exons sind in Form von blauen und roten (Ankyrin-Repeats) Balken dargestellt und nummeriert.

Über der Genstruktur sind die bereits identifizierten Mutanten von Moulik et al. und Duboscq-Bidot et al. eingezeichnet: Moulik et al. (gelbe Pfeile): P105S und V107L im Exon 3, M184I im Exon 5.

Duboscq-Bidot et al. (grüne Pfeile): E57Q und R66Q im Exon 2, T116M im Exon 4, L199R im Exon 6 sowie A276V im Exon 8.

Unterhalb der Genstruktur sind die Ergebnisse dieser Arbeit graphisch dargestellt:

P1= SNP Exon 1 170 C>T, P2= stille Mutation A36A im Exon 2, 1008 T>C, P4= Deletionen (16bp, 21bp, 26bp) im Intron 4, sowie der bekannte Polymorphismus rs56177217, P7= Polymorphismus im Intron 7 (rs3839939), P9= Polymorphismus im Intron 9 (rs3939).

Duboscq-Bidot et al. identifizierten 5 heterozygote Missense-Mutationen aus einem Kollektiv von 231 europäischen Patienten (2,2%) (**Abb. 6.2**). Auch in diesem Fall konnte keine der Varianten in 400 gesunden Probanden nachgewiesen werden. Zwei der Mutationen wurden bei Patienten mit der familiären Form einer DCM gefunden, die anderen drei bei Patienten mit idiopathischer DCM. Interessanterweise sind auch hier alle Mutationen in Protein-Domänen oder experimentell beschriebenen Interaktionsstellen des CARP lokalisiert. Jeweils eine Mutation liegt in den Ankyrin-Repeats 2 und 4, zwei weitere Mutationen in der Coiled-Coil-Domäne und eine Mutation ist in der PEST-Region des CARP lokalisiert.

Auch Duboscq-Bidot et al. führten weitere experimentelle Versuche mit ihren gefundenen Mutanten durch, um eventuelle funktionale Unterschiede zum

Wildtyp aufdecken zu können. Dabei gelang der Arbeitsgruppe unter anderem der Nachweis, dass eine Stimulation mit Adrenalin, einem Agonist am alpha-1-Rezeptor zu einer erhöhten nukleären CARP-Expression führt. Die erhöhte CARP-Expression lässt wiederum vermuten, dass CARP bei verstärktem Dehnungsreiz des Herzmuskels die Aufgabe eines Transkriptions-Repressors übernehmen könnte. Zusätzlich gelang es den Autoren mit Hilfe von Luciferase-Assays, eine eingeschränkte transkriptionale Repressoraktivität sowie eine stärkere Hypertrophie-Antwort der CARP-Mutanten nach Adrenalin-Stimulation darzustellen. Folglich hat die Arbeitsgruppe zeigen können, dass die von ihnen identifizierten Mutanten im ANKRD1-Gen das CARP-Protein in seiner Funktion beeinträchtigen.

Schon vor der Durchführung der beiden Mutationsscreenings des ANKRD1-Gens wurde vermutet, dass das CARP Aufgaben eines Regulators physiologischer sowie pathologischer Vorgänge im Herzen haben könne. So erbrachten Arber et al. den ersten Anhaltspunkt für einen möglichen Zusammenhang zwischen dem ANKRD1-Gen und Herzerkrankungen durch ihre Versuche mit Muskel-LIM-Protein-defizienten (MLP) Mäusen (Arber et al., 1997). Diese entwickelten aufgrund der fehlenden Expression des MLP, eines für die Entwicklung, Differenzierung und Funktion von Muskelzellen wichtigen Proteins, eine schwere dilatative Kardiomyopathie mit ventrikulärer Dilatation und Herzinsuffizienz. Interessanterweise wurde zudem eine signifikante Heraufregulierung des ANKRD1-Gens in den dilatierten und hypertrophierten Ventrikeln der Mäuse beobachtet (Arber et al., 1997). Wenige Jahre später analysierten Nagueh und Kollegen außerdem einen signifikant erhöhten ANKRD1-mRNA- und Protein-Gehalt in Myokardproben herzinsuffizienter Patienten mit idiopathischer DCM (Nagueh et al., 2004). Auf den ersten Blick lag der Verdacht nahe, dass die ANKRD1-Expression bei einer DCM im Endstadium spezifisch erhöht sein könnte. Weitere durchgeführte Tierversuche zeigten jedoch, dass die erhöhte ANKRD1-Expression des linken Ventrikels mit diversen kardialen Erkrankungen, wie zum Beispiel der kardialen Hypertrophie und Ischämie, ventrikulären Septumdefekten oder der ischämisch- und kardiotoxisch-induzierten Kardiomyopathie, assoziiert ist (Mikailov und Torrado, 2008). Die erhobenen Daten belegen, dass bei der Mehrheit der Patienten mit einer Herzinsuffizienz die Expressionsrate von CARP

erhöht ist. Folglich lassen diese Befunde vermuten, dass bei Erkrankungen des Myokards spezifische ANKRD1-Regulationsprogramme aktiviert werden können. So gesehen erscheint die gesteigerte Expression des CARP eine transkriptionale Adaptationsantwort des Herzens auf unspezifischen, nicht-physiologischen Stress oder einer Verletzung des Myokards zu sein (Mikailov und Torrado, 2008).

Einige Studien beschäftigten sich außerdem mit der Frage, ob CARP als negativer Regulator der kardiologischen Genexpression fungieren könnte. Mehrere durchgeführte Versuche bestätigten diese Vermutung. So bewiesen Zou et al. 1997, dass das CARP einen Komplex mit dem Transkriptionsfaktor YB-1 bildet und dadurch die Aktivierung des MLC-2v-Promotor inhibiert. Ein weiteres Experiment zeigte, dass eine CARP-Überexpression in neonatalen Kardiomyozyten die Genexpression des atrialen natriuretischen Peptids (ANP) oder des kardiospezifischen Troponin C (cTnc) herunterreguliert (Jeyaseelan et al., 1997). Um eine Relevanz *in vivo* beweisen zu können, sollten *in-vitro*-Ergebnisse formal durch weitere Tierversuche bestätigt werden. Allerdings konnte die mögliche Repressorfunktion des CARP mit Hilfe von Tierversuchen noch nicht zufrieden stellend dargestellt werden (Mikailov und Torrado, 2008).

Weitere Studien untersuchten das Expressionsverhalten des CARP während der embryonalen Entwicklung des Herzens. Trotz mehrerer durchgeführter Studien sind die ANKRD1-Expressionsmuster in fetalen, neonatalen und adulten Herzen sowie die Regulierung der Expressionsveränderungen während der Kardiogenese noch nicht vollständig verstanden. In relativ frühen Stadien der fetalen Kardiogenese von Mäusen konnte eine homogene Verteilung des CARP im kardialen Gewebe nachgewiesen werden (Zou et al., 1997). In der späten fetalen und neonatalen Phase war das Hybridisierungssignal des CARP im Myokard der Vorhöfe stärker als in den Kammern (Jeyaseelan et al., 1997). Bei 11-14 Wochen alten, menschlichen Feten konnte wiederum eine gleichmäßige Verteilung des CARP über das ganze Herz festgestellt werden (Ishiguro et al., 2002). Studien, die sich mit dem ANKRD1-Expressionsverhalten des Myokards des linken Ventrikels beschäftigten, zeigten ebenfalls keine eindeutigen Ergebnisse. So bestimmte eine Arbeitsgruppe einen höheren ANKRD1-Gehalt im fetalen Myokardgewebe

von Mäusen (Kuo et al., 1999), andere zeigten hingegen eine stete Zunahme der ventrikulären CARP-Expression von der späten fetalen über die neonatale bis hin zur adulten kardialen Entwicklungsstufe bei Ratten (Aihara et al., 2000) und Schweinen (Torrado et al., 2004).

Zusammenfassend deuten die Ergebnisse darauf hin, dass die ANKRD1-Expression nicht ausschließlich mit der fetalen Kardiogenese assoziiert ist. Die embryonale Expression scheint in der späten fetalen Phase unterdrückt und im Erwachsenenalter wieder reaktiviert zu werden. Somit könnte CARP nicht nur eine wichtige Rolle für regulatorische Aufgaben in der Kardiogenese innehaben, sondern auch an physiologischen und pathologischen Prozessen des Myokards mitbeteiligt sein. Zudem ist bekannt, dass die Kammern des fetalen und postnatalen Herzens extremen Belastungsschwankungen ausgesetzt sind. Demzufolge stellt der auf das Myokardgewebe unterschiedlich wirkende biomechanische Druck eine weitere, mögliche Erklärung für die variierende myokardiale CARP-Expression dar (Mikhailov und Torrado, 2008).

Das kardiale Gewebe besteht neben den Myozyten aus weiteren Zellen, wie den Myofibroblasten, Endothelzellen und Zellen, die an der Reizleitung beteiligt sind. Immunhistochemische Untersuchungen zeigten allerdings ein überwiegendes CARP-Vorkommen in Kardiomyozyten. Zudem fanden Torrado et al. eine signifikante CARP-Anreicherung in ventrikulären Purkinje-Zellen postnataler Schweine. Somit könnte das CARP außerdem eine bisher unbekannte Rolle in der postnatalen Entwicklung des speziellen Erregungsbildungs- und -leitungssystems des Herzens spielen (Torrado et al., 2005).

### **6.3 Limitationen der vorliegenden Arbeit**

Auftretenshäufigkeiten von Mutationen im ANKRD1-Gen von circa 2%, die in bereits durchgeführte Mutationsanalysen publiziert worden waren, konnte diese Arbeit nicht bestätigen. Dafür sind folgende Gründe zu diskutieren: Möglicherweise ist das untersuchte Kollektiv mit 161 DCM-Patienten noch zu klein gewesen. Gegebenenfalls hätte die Untersuchung des ANKRD1-Gens bei einer größeren Anzahl von Patienten ein anderes Ergebnis gezeigt. Allerdings ist die dilatative Kardiomyopathie im Vergleich zu anderen kardiologi-

schen Erkrankungen eine sehr seltene Herzerkrankung, so dass es sich als Schwierigkeit darstellt große Patientenkollektive für experimentelle Studien zu gewinnen.

Eine weitere mögliche Limitation stellt die angewandte Screeningmethode dieser Arbeit dar. Die SSCP-Technik ist eine schon seit langer Zeit angewandte und gut validierte Methode, um große Quantitäten von Proben auf Mutationen zu untersuchen. Die Vorteile dieser Methode liegen unter anderem in ihrer guten Praktikabilität und Wirtschaftlichkeit. Weitere Fortschritte in der Entwicklung immer effizienterer Laborgeräte werden es zukünftig erlauben, auch weitaus größere Patientenkollektive mittels Sequenzierung zu untersuchen. Somit wird es möglich sein, die Sensitivität der Mutationsanalysen weiter zu erhöhen.

#### **6.4 Ausblick**

Das Ergebnis dieser Arbeit bestätigt, dass Mutationen im ANKRD1-Gen nur für einen Bruchteil von DCM-Erkrankungen verantwortlich gemacht werden können. Die Pathogenese der DCM ist von allen Kardiomyopathien vergleichsweise heterogen basierend auf einem umfangreichen Katalog unterschiedlicher nosologischer Entitäten. Aufgrund der aktuellen Studienlage muss derzeit von einer multifaktoriellen Genese ausgegangen werden. Es müssen unterschiedliche, bisher nicht gänzlich verstandene Mechanismen existieren, die letztendlich zu einer Manifestation der Erkrankung führen. Doch verstehen wir bisher nur fragmentarisch, welche Rolle dabei einzelnen Kandidatengen unter epidemiologischen Gesichtspunkten zukommt. Pathophysiologisch interessant sind zudem die Überschneidungsbereiche zwischen dilatativen Kardiomyopathien und anderen Formen von Herzmuskelerkrankungen. So ließ sich durch Mutationsanalysen zeigen, dass Mutationen an unterschiedlichen Positionen des gleichen Gens eine hypertrophe oder dilatative Verlaufsform der Kardiomyopathie auslösen. Bisweilen bleibt es jedoch unklar, ob eine klare Genotyp-Phänotyp-Beziehung besteht (Schönberger et al., 2004).

Der aktuelle Wissensstand über die DCM zeigt, dass weitere Bemühungen notwendig sind, um die verschiedenen pathophysiologischen Signalwege besser zu verstehen. Erst durch die Charakterisierung der multifaktoriellen Genese dieser heterogenen Krankheitsgruppe wird es zukünftig möglich sein, diese eventuell schon in Frühformen zu diagnostizieren, um somit Betroffene in allen Stadien ihrer Erkrankung individuell und bestmöglich zu therapieren.

## 7 Zusammenfassung

Die dilatative Kardiomyopathie (DCM) ist eine Erkrankung des Herzmuskels, die diesen sowohl strukturell, wie auch funktionell verändert. Die gestörte Myokardarchitektur äußert sich klinisch in einer Herzinsuffizienz, die bei fast der Hälfte aller Patienten innerhalb der ersten zwei Jahre nach Diagnosestellung zum Tod führt. Die DCM ist somit eine der häufigsten Ursachen für Herzversagen und die führende Indikation zur Herztransplantation. Durch Kopplungsanalysen und die Analyse von Kandidatengenomen bei Familien mit DCM konnten in den letzten Jahren über 20 verschiedene, krankheitsverursachende Gene identifiziert werden. Eines dieser Gene ist das Ankyrin-Repeat-Domain-1-Gen (ANKRD1), das für das kardiale Ankyrin-Repeat-Protein (CARP) codiert. In Anlehnung an genetische und funktionelle Untersuchungen der bislang charakterisierten CARP-Mutanten wurde die Hypothese, dass Mutationen im ANKRD1-Gen mit der DCM-Entstehung in Zusammenhang stehen, bekräftigt. Aktuell wird das ANKRD1-Gen für etwa zwei Prozent der Erkrankungsfälle verantwortlich gemacht.

In der vorliegenden Arbeit sollte das ANKRD1-Gen auf weitere genetische Veränderungen untersucht und der Einfluss des Gens auf die Krankheitsentstehung weiter präzisiert werden. Deshalb wurde bei insgesamt 161 DCM-Patienten eine systematische Mutationssuche im Gen des kardialen Ankyrin-Repeat-Proteins durchgeführt. Zu diesem Zweck wurde aus Blutproben der Patienten zunächst die genomische DNA extrahiert und im Anschluss daran alle neun Exons mittels PCR amplifiziert. Mit den entstandenen Amplifikaten wurde anschließend eine Einzelstrang-Konformations-Polymorphismus-Analyse (SSCP) durchgeführt. Im Falle einer Abweichung des Laufmusters wurde das PCR-Produkt aufgereinigt und sequenziert. Eine stille Mutation im Exon 2, ein bisher unbekannter Polymorphismus im Exon 1 und sechs bekannte Polymorphismen in den Introns 4, 7 und 9 konnten so identifiziert werden. Ob die in der vorliegenden Arbeit erstmalig identifizierte, stille Mutation in Nukleotidposition 1008 einen Einfluss auf die Entstehung einer DCM hat bleibt unklar. Weitere funktionelle Versuche mit der Mutante sind durchzuführen, um mögliche Auswirkungen

der Nukleotidsubstitution auf die funktionale Integrität und die Proteinexpression des CARP zu prüfen. Ein bisher unbekannter Polymorphismus wurde im Exon 1 identifiziert und trat mit einer Häufigkeit von 1,2% im untersuchten Patientenkollektiv auf. Um zu klären, ob diese Variante gehäuft bei DCM-Patienten auftritt, wurden zudem 202 gesunde Kontrollen auf diesen Polymorphismus untersucht. In der Kontrollgruppe ließ sich die Nukleotidtransition ebenfalls in 1,0% der Fälle nachweisen. Aufgrund der nicht signifikant abweichenden Allelfrequenz des neu identifizierten Polymorphismus kann mit großer Wahrscheinlichkeit davon ausgegangen werden, dass dieser keine krankheitsverursachende Rolle bei der Pathogenese einer DCM einnimmt. Für die bekannten, identifizierten Polymorphismen in den Introns 4, 7 und 9 ist die Auftretenshäufigkeit in verschiedenen, ethnischen Gruppen teilweise bekannt.

Zusammenfassend konnten die bereits publizierten Auftretenshäufigkeiten von Mutationen im ANKRD1-Gen von circa 2% durch diese Arbeit nicht bestätigt werden. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass Mutationen im ANKRD1-Gen nur für einen Bruchteil von DCM-Erkrankungen verantwortlich gemacht werden können und unterstreichen die nosologische Heterogenität der DCM. Erst durch die Charakterisierung der multifaktoriellen Genese dieser heterogenen Krankheitsgruppe wird es zukünftig möglich sein, diese eventuell schon in Frühformen zu diagnostizieren und Betroffene in allen Stadien ihrer Erkrankung individuell und bestmöglich zu therapieren.

## Summary

Dilated cardiomyopathy is a primary disorder of the cardiac muscle. The structural alterations of the cardiac muscle lead to heart failure which results in death in almost every second case within two years after diagnosis. Therefore DCM is one of the most common causes of heart failure and the most common indication for cardiac transplantation. Due to linkage analysis and the analysis of candidate genes of families with DCM, mutations in more than 20 genes were discovered by now. One of these genes is the ankyrin-repeat-domain-1 gene (ANKRD1) which encodes for the cardiac-ankyrin-repeat protein (CARP). On the basis of genetic and functional analysis of CARP mutations the hypothesis for a possible role of CARP being responsible for causing DCM was confirmed. To date, genetic variants in CARP account for approximately two percent of all DCM cases.

In this thesis the ANKRD1 was examined for further genetic alterations that could specify the impact of the gene on the pathogenesis of DCM. A systematic mutation analysis with the ANKRD1 gene in 161 DCM patients was accomplished. The genomic DNA was extracted from whole blood and the nine exons of the gene were amplified by PCR. Subsequently the single-strand-conformation-polymorphism analysis (SSCP) was performed. In case of a mobility-shift of a single-stranded DNA fragment the particular exon was sequenced. A silent mutation in exon 2, one unknown polymorphism in exon 1 and six known polymorphisms were identified. It remains uncertain whether the silent mutation has an impact on the pathogenesis of DCM. Further experiments would have to be performed to investigate possible negative effects regarding the functional integrity and expression of CARP due to the nucleotid substitution. One unknown polymorphism in exon 1 was identified in 1.2% of the analyzed cohort. 202 healthy control subjects were also tested for this polymorphism which occurred in 1.0 % of the cases. Because of the non-significant result it can be assumed that the polymorphism in exon 1 is not causing the disease. The prevalences of the identified polymorphisms in intron 4, 7 and 9 are already known.

Taken together this thesis could not confirm the published prevalences of mutations in the ANKRD1 gene, which according to the literature occurred in

approximately two percent of the DCM cases. The results indicate that mutations in ANKRD1 can be only responsible for a minority of DCM patients. This finding underlines that DCM is genetically a heterogenous disease. Further systematic screenings in DCM are necessary for an early diagnosis and optimal treatment.

## 8 Literatur

Aihara Y., Kurabayashi M., Arai M., et al. (2000): Cardiac ankyrin repeat protein is a novel marker of cardiac hypertrophy: role of M-CAT element within the promoter, *Hypertension* **36**, 48-53.

Arber S., Hunter J.J., Ross J., et al. (1997): MLP-deficient mice exhibit a disruption of cardiac cytoarchitectural organization, dilated cardiomyopathy, and heart failure, *Cell* **88**, 393-403.

Barash I.A., Bang M.-L., Mathew L., et al. (2007): Structural and regulatory roles of muscle ankyrin repeat protein family in skeletal muscle, *Am J Physiol Cell Physiol* **293**, 218-27.

Bienengräber M., Olson T.M., Selivanov V.A., et al. (2004): ABCC9 mutations identified in human dilated cardiomyopathy disrupt catalytic KATP channel gating, *Nat Gen* **36**, 382-87.

Bione S., D'Adamo P., Maestrini E., et al. (1996): A novel X-linked gene, G4.5, is responsible for Barth syndrome, *Nat Gen* **12**, 385-89.

Blanshard P.T. (1953): Isolated diffuse myocarditis, *Br Heart J* **15**, 453-55.

Bobadilla J.L., Macek M., Fine J.P., et al. (2002): Cystic fibrosis: A worldwide analysis of CFTR mutations - correlation with incidence data and application to screening, *Hum Mutat* **19**, 575-606.

Bowles K.R., Gajarski R., Porter P., et al. (1996): Gene mapping of familial autosomal dominant dilated cardiomyopathy to chromosome 10q21-23, *J Clin Invest* **98**, 1355-60.

Bowles N. E., Bowles K. R. und Towbin J. A. (2000): The "final common pathway" hypothesis and inherited cardiovascular disease. The role of cytoskeletal proteins in dilated cardiomyopathy, *Herz* **3**, 168-75.

Breeden L., Nasmyth K. (1987): Similarity between cell-cycle genes of budding yeast and fission yeast and the notch gene of *Drosophila*, *Nature* **329**, 651-54.

Bridgen W. (1957): Uncommon myocardial diseases: the non-coronary cardiomyopathies, *Lancet* **2**, 1179-84.

Bulmer M. (1988): Codon usage and intragenic position, *J Theor Biol* **133**, 67-71.

Carniel E., Taylor M.R., Sinagra G., et al. (2005) : Alpha-myosin heavy chain: a sarcomeric gene associated with dilated and hypertrophic phenotypes of cardiomyopathy, *Circulation* **112**, 54-59.

Chu W., Burns D.K., Swerlick R.A., Presky D.H. (1995): Identification and characterization of a novel cytokine-inducible nuclear protein from human endothelial cells, *J Biol Chem* **270**, 10236-45.

Coonar A.S., Protonotarios N., Tsatsopoulou A., et al. (1998): Gene for arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy with diffuse non-epidermolytic palmoplantar keratoderma and wooly hair (Naxos disease) maps to 17q21, *Circulation* **97**, 2049-58.

Dec G.W., Fuster V. (1994): Idiopathic dilated cardiomyopathy, *N Engl J Med* **331**, 1564-75.

Duboscq-Bidot L., Charron P., Ruppert V., et al. (2009): Mutations in the ANKRD1 gene encoding CARP are responsible for human dilated cardiomyopathy, *Eur Heart J* **30**, 2128-36.

Durand J.-B., Bachinski L.L., Bieling L.C., et al. (1995): Localization of a gene responsible for familial dilated cardiomyopathy to chromosome 1q32, *Circulation* **92**, 3387-89.

Elliott P., Andersson B., Arbustini E., et al. (2008): Classification of the cardiomyopathies: a position statement from the European Society Of Cardiology Working Group on myocardial and pericardial diseases, *Eur Heart J* **29**, 270–76.

Erdmann, E. (2009): Klinische Kardiologie, 7.Auflage, *Springer Verlag*, 305ff.

Evans W. (1949): Familial cardiomegaly, *Br Heart J* **11**, 68.

Fatkin D., MacRae C., Sasaki, T., et al. (1999): Missense mutations in the rod domain of the lamin A/C gene as causes of dilated cardiomyopathy and conduction-system disease, *N Engl J Med* **341**, 1715-24.

Felker G.M., Thompson R.E., Hare J.M. (2000): Underlying causes and long-term survival in patients with initially unexplained cardiomyopathy, *N Engl J Med* **342**, 1077-84.

Fuster V., Gersh B.J., Giuliani E.R., et al. (1981): The natural history of idiopathic dilated cardiomyopathy, *Am J Cardiology* **47**, 525-31.

Gaunt R.T. und Lecutier M.A. (1956): Familial cardiomegaly, *Br Heart J* **18**, 251-58.

Gerull B., Gramlich M., Atherton J., et al. (2002): Mutations of TTN, encoding the giant muscle filament titin, cause familial dilated cardiomyopathy, *Nat Genet* **30**, 201-4.

Grantham R., Gautier C., Gouy M., et al. (1980) : Codon catalog usage and the genome hypothesis, *Nucleic Acids Res* **8**, 49-62.

Grünig E., Tasman J.A., Kücherer H., et al. (1998): Frequency and phenotypes of familial dilated cardiomyopathy, *J Am Coll Cardiol* **31**, 181-90.

Hayashi K. (1991): PCR-SSCP: A simple and sensitive method for detection of mutations in the genomic DNA, *Genome Res* **1**, 34-38.

Ikeda K., Emoto N., Matsuo M., Yokoyama M. (2003): Molecular identification and characterization of a novel nuclear protein whose expression is upregulated in insulin-resistant animals, *J Biol Chem* **278**, 3514-20.

Ishiguro N., Baba T., Ishida T., et al. (2002): Carp, a cardiac ankyrin-repeated protein, and its new homologue, Arpp, are differentially expressed in heart, skeletal muscle, and rhabdomyosarcomas, *Am J Pathol* **160**, 1767-78.

Jeyaseelan R., Poizat C., Baker R.K., et al. (1997): A novel cardiac-restricted target for doxorubicin, CARP, a nuclear modulator of gene expression in cardiac progenitor cells and cardiomyocytes, *J Biol Chem* **272**, 22800-808.

Jung M., Poepping I., Perrot A., et al. (1999): Investigation of a family with autosomal dominant dilated cardiomyopathy defines a novel locus on chromosome 2q14-q22, *Am J Hum Genet* **65**, 1068-77.

Kamisago M., Sharma S.D., DePalma S.R., et al. (2000): Mutations in sarcomere protein genes as a cause of dilated cardiomyopathy, *N Engl J Med* **343**, 1688-96.

Kemp T.J., Sadusky T.J., Saltisi F., et al. (2000): Identification of Ankrd2, a novel skeletal muscle gene coding for a stretch-responsive ankyrin-repeat protein, *Genomics* **66**, 229-41.

Knöll R., Hoshijima M., Hoffman H. M., et al. (2002): The cardiac mechanical stretch sensor machinery involves a Z disc complex that is defective in a subset of human dilated cardiomyopathy, *Cell* **111**, 943-55.

Kojic S., Medeot E., Guccione E., et al. (2004): The Ankrd2-protein, a link between the sarcomere and the nucleus in skeletal muscle, *J Mol Biol* **339**, 313-25.

Konstantinos K.V., Panagiotis P., Antonios V.T., et al. (2008): PCR-SSCP: A method for the molecular analysis of genetic diseases, *Mol Biotechnol* **38**, 155-63.

Krajinovic M., Pinamonti B., Sinagra G., et al. (1995): Linkage of familial dilated cardiomyopathy to chromosome 9. Heart muscle disease study group, *Am J Hum Genet* **57**, 846-52.

Kuo H., Chen J., Ruiz-Lozano P., et al. (1999): Control of segmental expression of the cardiac-restricted ankyrin repeat protein gene by distinct regulatory pathways in murine cardiogenesis. *Development* **126**, 4223-34.

Li D., Tapscoft T., Gonzalez O., et al. (1999): Desmin mutation responsible for idiopathic dilated cardiomyopathy, *Circulation* **100**, 461-64.

Luk A., Ahn E., Soor G.S., et al. (2009): Dilated cardiomyopathy: a review, *J Clin Pathol* **62**, 219-25.

Lux S.E., John K.M., Bennett V. (1990): Analysis of cDNA for human erythrocyte ankyrin indicates a repeated structure with homology to tissue-differentiation and cell-cycle control proteins, *Nature* **344**, 36-42.

Maron B.J., Towbin J.A., Thiene G., et al. (2006): Contemporary definitions and classification of the cardiomyopathies. An American Heart Association scientific statement from the Council on clinical Cardiology, Heart failure and Transplantation Committee; Quality of care and outcomes research and functional genomics and translational biology interdisciplinary working groups; and Council on Epidemiology and Prevention, *Circulation* **113**, 1807-16.

McNair W.P., Ku L., Taylor M.R., et al. (2004): SCN5A mutation associated with dilated cardiomyopathy, conduction disorder, and arrhythmia, *Circulation* **110**, 2163-67.

Messina D.N., Speer M.C., Pericak-Vance M.A. und McNally E.M. (1997): Linkage of familial dilated cardiomyopathy with conduction defect and muscular dystrophy to chromosome 6q23, *Am J Hum Genet* **61**, 909-17.

Mestroni L., Miani D., Di Lenarda A., et al. (1990): Clinical and pathologic study of familial dilated cardiomyopathy, *Am J Cardiology* **65**, 1449-53.

Michels V.V., Moll P.P., Miller F.A., et al. (1992): The frequency of familial dilated cardiomyopathy in a series of patients with idiopathic dilated cardiomyopathy, *N Engl J Med* **326**, 77-82.

Mikhailov A.T. und Torrado M. (2008): The enigmatic role of the ankyrin repeat domain 1 gene in heart development and disease, *Int J Dev Biol* **52**, 811-21.

Miller M.K., Bang M.-L., Witt Ch.C., et al. (2003) : The muscle ankyrin repeat proteins: CARP, ankrd2/Arpp and DARP as a family of titin-filament-based stress response molecules, *J Mol Biol* **333**, 951-64.

Mohapatra B., Jimenez S., Lin J.H., et al. (2003): Mutations in the muscle LIM protein and alpha-actinin-2 genes in dilated cardiomyopathy and endocardial fibroelastosis, *Mol Genet Metab* **80**, 207-15.

Mogensen J., Murphy R.T., Shaw, T., et al. (2004): Severe disease expression of cardiac troponin C and T mutations in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy, *J Am Coll Cardiol* **44**, 2033-40.

Moulik M., Vatta M., Witt S.H., et al. (2009): ANKRD1, the gene encoding cardiac ankyrin repeat protein, is a novel dilated cardiomyopathy gene, *J Am Coll Cardiol* **54**, 325-33.

Mullis K.B., Faloona F.A. (1987): Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction, *Methods Enzymol* **155**, 335-50.

Muntoni F., Cau M., Ganau A., et al. (1993): Brief report: deletion of the dystrophin muscle-promoter region associated with X-linked dilated cardiomyopathy, *N Engl J Med* **329**, 921-25.

Murphy R.T., Mogensen J., Shaw A., et al. (2004): Novel mutation in cardiac troponin I in recessive idiopathic dilated cardiomyopathy, *Lancet* **363**, 371-72.

Nagueh S.F., Shah G., Wu Y., et al. (2004): Altered titin expression, myocardial stiffness, and left ventricular function in patients with dilated cardiomyopathy, *Circulation* **110**, 155-62.

Olson T.M., Illenberger S., Kishimoto N.Y., et al. (2002): Metavinculin mutations alter actin interaction in dilated cardiomyopathy, *Circulation* **105**, 431-37.

Olson T.M., Kishimoto N.Y., Whitby F.G. und Michels V.V. (2001): Mutations that alter the surface charge of alpha-tropomyosin are associated with dilated cardiomyopathy, *J Mol Cell Cardiol* **33**, 723-32.

Olson T.M., Michels V.V., Thibodeau S.N., et al. (1998) : Actin mutation in dilated cardiomyopathy, a heritable form of heart failure, *Science* **280**, 750-52.

Osterziel K.J. und Perrot A. (2005): Dilated cardiomyopathy: more genes means more phenotypes, *Eur Heart J* **26**, 751-54.

Orita M., Iwahana H., Kanazawa H., et al. (1989): Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms, *Proc Natl Acad Sci USA* **86**, 2766-70.

Pankuweit S. et al. (2009): Kardiomyopathie und Myokardbiopsie im Spiegel der neuen Klassifikationen, *Herz* **34**, 55-62.

Richardson P., McKenna W., Bristow, M., Maisch B., et al. (1996): Report of the 1995 World Health Organization/International Society and Federation of Cardiology Task Force on the definition and classification of cardiomyopathies, *Circulation* **93**, 841-42.

Samaras S.E., Yubin S., Davidson J.M. (2007): Novel actions of cardiac ankyrin repeat protein, *Int Congr* **1302**, 53-64.

Schmitt J.P., Kamisago M., Asahi M., et al. (2003): Dilated cardiomyopathy and heart failure caused by a mutation in phospholamban, *Science* **299**, 1410-13.

Schönberger J., Wang L., Shin J.T., et al. (2005): Mutation in the transcriptional coactivator EYA4 causes dilated cardiomyopathy and sensorineural hearing loss, *Nat Genet* **27**, 27.

Schönberger J., Zimmer M., Ertl G. (2004): Genetik der dilatativen Kardiomyopathie, *Deutsches Ärzteblatt* **101**, 1099-105.

Schrijver I., Rappahahn K., Pique L., et al. (2008): Multiplex ligation-dependent probe amplification identification of whole exon and single nucleotide deletions in the CFTR gene of Hispanic individuals with cystic fibrosis, *J of Mol Diagn* **10**, 368-75.

Sedgwick S.G. und Smerdon J. (1999): The ankyrin repeat: a diversity of interactions on a common structural framework, *Trends Biochem Sci* **24**, 311-16.

Sharp P.M. und Li W.-H. (1986): An evolutionary perspective on synonymous codon usage in unicellular organisms, *J Mol Evol* **24**, 28-38.

Sinagra G., Di L.A., Brodsky G.L., et al. (2001): Current perspective new insights into the molecular basis of familial dilated cardiomyopathy. *Ital Heart J* **2**, 280-86.

Sylvius N., Tesson F., Gayet C., et al. (2001): A new locus for autosomal dominant dilated cardiomyopathy identified on chromosome 6q12-q16, *Am J Hum Genet* **68**, 241-46.

Torrado M., Iglesias R., Nespereira B., et al. (2009): Intron retention generates ANKRD1 splice variants that are co-regulated with the main transcript in normal and failing myocardium, *Gene* **440**, 28-41.

Torrado M., Lopez E., Centeno A., et al. (2004): Left-right asymmetric ventricular expression of CARP in the piglet heart: regional response to experimental heart failure, *Eur J Heart Fail* **6**, 161-72.

Torrado M., Nespereira B., Lopez E., et al. (2005): ANKRD1 specifically binds CASQ2 in heart extracts and both proteins are co-enriched in piglet cardiac purkinje cells, *J Mol Cell Cardiol* **38**, 353-65.

Tsubata S., Bowles K.R., Vatta M., et al. (2000): Mutations in the human delta-sarcoglycan gene in familial and sporadic dilated cardiomyopathy, *J Clin Invest* **106**, 655-62.

Weil J., Schunkert H. (2006): Pathophysiologie der chronischen Herzinsuffizienz, *Clin Res Cardiol* **95**, 1-17.

Whitfield A.G. (1961): Familial cardiomyopathy, *Quart J Med* **3**, 119-34.

Witt S.H., Labeit D., Granzier H., et al. (2005) Dimerization of the cardiac ankyrin protein CARP: implications for MARP titin-based signaling, *J Muscle Res Cell Motil* **26**, 401-8.

Woiseschläger Ch. (2006): Therapie der Herzinsuffizienz- Angiotensin-II-Rezeptorblocker bei Herzinsuffizienz als Kombinationspartner oder Alternative, *Austr J of Cardiol* **13**, 1-2.

Zhang G., Hubalewska M. und Ignatova Z. (2008): Transient ribosomal attenuation coordinates protein synthesis and co-translational folding, *Nature Structural Mol Biol* **16**, 274-80.

Zou Y., Evans S., Chen J., et al. (1997): CARP, a cardiac ankyrin repeat protein, is downstream in the Nkx2-5 homeobox gene pathway, *Development* **124**, 793-804.

(1980): Report of the WHO/ISFC task force on the definition and classification of cardiomyopathies, *Br Heart J* **44**, 672-73.

## 9 Verzeichnis akademischer Lehrer

Meine akademischen Lehrer in Marburg waren Damen und Herren:

Adamkiewicz	Aigner	Aumüller
Banzhoff	Barth	Bartsch
Basler	Bauer	Baum
Baumann	Becker	Berger
Bette	Bien	Bolm
Brehm	Cetin	Czubayko
Daut	Del Rey	Dietrich
Donner-Banzhoff	Eberhardt	Eickmann
Eilers	Fendrich	Feuser
Fritz	Geks	Gerdes
Glorius	Görg	Gress
Grimm	Grundmann	Grzeschik
Hasilik	Hegele	Hertl
Heverhagen	Höffken	Hofmann
Höglinger	Horn	Hoyer
Hundt	Kalinowski	Kann
Kaufmann	Kerzel	Kill
Kim-Berger	Kircher	Klenk
Klingmüller	Klose	König
Koolman	Kortus-Götze	Kuhlmann
Leonhardt	Lill	Liss
Lohoff	Löffler	Maier
Maisch	Maisner	Mandrek
Meyer	Michl	Mittag
Moll	Moosdorf	Mueller
Müller	Mutters	Neubauer
Neumüller	Nimphius	Oertel
Olbert	Opitz	Pagenstecher
Plant	Printz	Ramaswamy

Rausch	Renz	Richter
Röhm	Röper	Rosenow
Rothmund	Ruchholtz	Schade
Schäfer	Schmidt	Schofer
Schrader	Schultze	Schütz
Seitz	Sekundo	Sönnichsen
Steinfeldt	Steiniger	Tackenberg
Teymoortash	Timmesfeld	Vogelmeyer
Voigt	Wagner	Waldegger
Weihe	Werner	Westermann
Westhoff	Wiegand	Wrocklage
Wündisch	Wulff	Zwiorek

## Danksagung

Ein ganz besonderer Dank geht an meinen Doktorvater Prof. Dr. mult. Thomas Meyer. Ich bedanke mich für die kritischen und konstruktiven inhaltlichen Anmerkungen während der Planung, Durchführung und Auswertung der vorliegenden Arbeit.

Der Klinik für Innere Medizin mit dem Schwerpunkt Kardiologie unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Maisch bedanke ich mich für die Bereitstellung des Themas sowie des Arbeitsplatzes.

Bei Herrn Dr. Volker Ruppert bedanke ich mich für die Einführung in die molekularbiologischen Methoden sowie für viele wegweisende Erklärungen und Ideen.

Ein weiterer Dank geht an Frau Dr. Verena Koch und Frau Dr. Julia Staab, an meine Mitdoktoranden/innen sowie an alle Mitarbeiter und Mitarbeiterinnen des Instituts für die nette Zusammenarbeit und die zahllosen aufmunternden Gespräche und Kaffeepausen.

Allen meinen Freunden und meiner Schwester Luisa danke ich für die Bestärkung und Aufmunterungen sowohl während meiner Arbeit an der Dissertation als auch des gesamten Medizinstudiums.

Meinem Freund Benjamin möchte ich für seine Ruhe und Geduld mit mir danken. Herzlichen Dank für die Unterstützung und den Beistand, den er jederzeit zu geben bereit ist.

Nicht zuletzt danke ich meinen Eltern, Frank und Petra Ackermann, die in jeglicher Hinsicht die Grundsteine für meinen Weg gelegt und mich auf diesem all die Jahre liebevoll unterstützt haben. Ohne sie wäre sowohl das Studium als auch die Dissertation nicht möglich gewesen.