

Aus dem Institut für Klinische Biochemie und Pathobiochemie
der Universität Würzburg

Vorstand: Professor Dr. med. Ulrich Walter

**Mutationen im Gen der
Dihydrolipoamid-Dehydrogenase bei Patienten mit
familiärer dilatativer Kardiomyopathie**

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
vorgelegt von
Christian Möller
aus Münchberg

Würzburg, November 2011

Referent: Prof. Dr. M. Zimmer

Korreferent: Prof. Dr. T. Haaf

Dekan: Prof. Dr. M. Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 10.12.2012

Der Promovend ist Arzt.

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

1	Einführung.....	1
1.1	DILATATIVE KARDIOMYOPATHIE	1
1.2	ENTDECKUNG EINER NEUEN DCM-MUTATION	7
1.3	DIE DIHYDROLIPOAMID-DEHYDROGENASE	8
1.4	MUTATIONEN IM GEN DER DLD	9
1.5	EINFÜHRUNG IN DIE DENATURING HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY.....	12
1.6	DAS HAPMAP PROJEKT.....	16
1.7	ZIELSETZUNG DER ARBEIT	18
2	Methoden und Material.....	19
2.1	POLYMERASE-KETTENREAKTION.....	19
2.1.1	<i>Ablauf einer Polymerase-Kettenreaktion.....</i>	19
2.1.2	<i>Besonderheiten der Touch Down PCR.....</i>	20
2.1.3	<i>Einzelschritte im Detail</i>	21
2.1.4	<i>Primerdesign.....</i>	22
2.2	AGAROSE - GELELEKTROPHORESE	24
2.3	HETERODUPLEXANALYSE MITTELS DENATURING HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY	25
2.3.1	<i>Vorbereitung der Proben</i>	26
2.3.2	<i>Einstellung der Schmelzprofile</i>	26
2.3.3	<i>Analyse der PCR-Produkte</i>	28
2.4	SEQUENZIERUNG.....	28
2.4.1	<i>Vorbereitung der PCR-Produkte.....</i>	29
2.4.2	<i>Sequenzierungsreaktion</i>	30
2.4.3	<i>Fällung der Sequenzierungsprodukte</i>	31
2.4.4	<i>Sequenzanalyse</i>	31
2.5	EINORDNUNG POSITIVER FUNDE	32
2.6	EINSCHLUSSKRITERIEN FÜR DIE PATIENTEN	32
2.7	MATERIAL	34
2.7.1	<i>Verbrauchsmaterialien und Chemikalien.....</i>	34
2.7.2	<i>Enzyme.....</i>	34
2.7.3	<i>Geräte und Software.....</i>	35
3	Ergebnisse	35
3.1	PCR-PRODUKT 6	36
3.2	PCR-PRODUKT 7	38
3.3	PCR-PRODUKT 8	40
3.4	PCR-PRODUKT 13+14 UND PCR-PRODUKT 14	42
3.5	ZUSAMMENFASSUNG DER DETEKTIERTEN MUTATIONEN.....	45
4	Diskussion.....	46
4.1	AUSWAHL DER METHODE	46
4.2	BEDEUTUNG ZUSÄTZLICHER PEAKS IN ABWESENHEIT EINER MUTATION.....	47
4.3	BEDEUTUNG VON MUTATIONEN IN EXONS UND INTRONS	48
4.4	INTERPRETATION DER ERGEBNISSE	49
5	Zusammenfassung.....	54
6	Literatur- und Abbildungsverzeichnis.....	56

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenosin
ABI	Applied Biosystems
ARVCM	Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy (dt.: Arrhythmogene rechtsventrikuläre Kardiomyopathie)
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
β-MHC	β-myosin heavy chain (dt.: schwere Kette des β-Myosin)
C	Cytosin
CCD	Charge-coupled device (dt.: ladungsgekoppelte Vorrichtung)
DCM	Dilated cardiomyopathy (dt.: Dilatative Kardiomyopathie)
ddNTP	Didesoxynukleosidtriphosphat
DHPLC	Denaturing high-performance liquid chromatography (dt.: Denaturierende Hochleistungs- Flüssigkeitschromatographie)
DLD	Dihydrolipoamid-Dehydrogenase
DNA	Deoxyribonucleic acid (dt.: Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
ECS	European Society of Cardiology (dt.: Europäische Gesellschaft für Kardiologie)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EtOH	Ethanol
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FDC	Familial dilated cardiomyopathy (dt.: Familiäre dilatative Kardiomyopathie)
G	Guanosin
HCM	Hypertrophic cardiomyopathy (dt.: Hypertrophe Kardiomyopathie)
IDC	Idiopathic dilated cardiomyopathy (dt.: Idiopathische dilatative Kardiomyopathie)
kb	Kilobasen

kDa	Kilodalton
LMNA	Lamin A/C
Mb	Megabasen
min	Minuten
MSUD	Maple syrup urine disease (dt.: Ahornsirupkrankheit)
NaOAc	Natriumacetat
nm	Nanometer
PCR	Polymerase chain reaction (dt.: Polymerase-Kettenreaktion)
RCM	Restrictive cardiomyopathy (dt.: Restriktive Kardiomyopathie)
s	Sekunden
SNP	Single nucleotide polymorphism (dt.: Einzelnukleotid-Polymorphismus)
T	Thymin
TAE	Trisacetat
TEAA	Triethylammoniumacetat
TnC	Troponin C
TnI	Troponin I
TnT	Troponin T
U	Unit
UTR	Untranslated region (dt.: nicht translatierte Region)
WHO	World Health Organization (dt.: Weltgesundheitsorganisation)

1 Einführung

1.1 Dilatative Kardiomyopathie

Kardiomyopathien bezeichnen Erkrankungen des Herzens, die mit einer kardialen Dysfunktion einhergehen und deren Ursache eine krankhafte Veränderung des Herzmuskels selbst ist. Unterschieden werden hierbei fünf Hauptgruppen – die dilatative (DCM), hypertrophe (HCM), restriktive (RCM), arrhythmogene rechtsventrikuläre Kardiomyopathie (ARVCM) und die nicht klassifizierbaren Kardiomyopathien [1]. Diese Einteilung der Weltgesundheitsorganisation (WHO) stützt sich vor allem auf die morphologischen sowie echokardiographischen Erscheinungsformen der Kardiomyopathien [2].

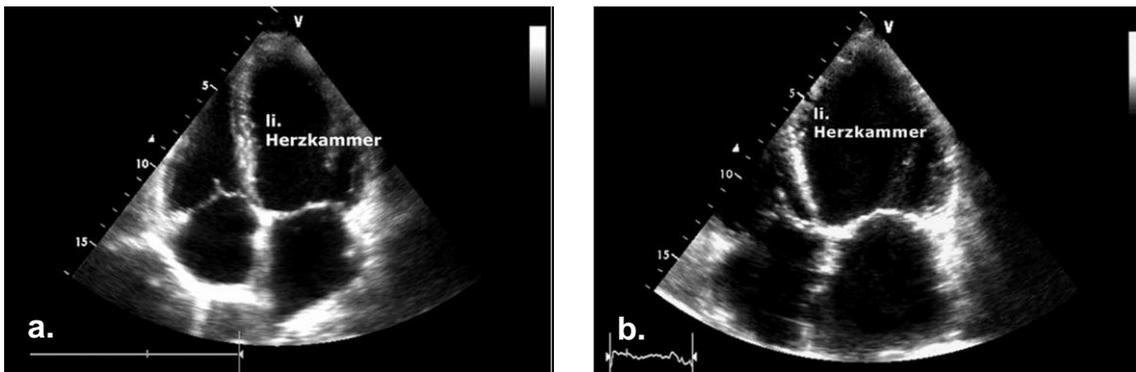


Abbildung 1.1: Echokardiographische Darstellung im 4-Kammer-Blick. a. Darstellung eines normal konfigurierten Herzens. b. Darstellung eines kardiomyopathisch dilatierten Herzens. Alle vier Herzkammern, vor allem aber die linke Herzkammer sind massiv dilatiert (aus^a).

Als Auslöser für Kardiomyopathien kommen genetische Mutationen, Infektionen sowie entzündliche, autoimmune und toxische Schädigungen des Myokards in Frage. Welche Rolle dabei Umweltfaktoren oder Polymorphismen spielen, ist bisher nicht abschließend geklärt [2]. Der Tatsache Rechnung tragend, dass viele Kardiomyopathien durch Genmutationen ausgelöst werden, erarbeitete die Europäische Gesellschaft für Kardiologie (ESC) eine Erweiterung der WHO-Einteilung.

^a <http://www.cardiologie-rheinklinik.de/5100459977124bf52/5100459977125bf5f/index.html>

In der ESC-Klassifikation wird zusätzlich zwischen familiären/genetischen und nicht familiären/nicht genetischen Kardiomyopathien unterschieden [3].

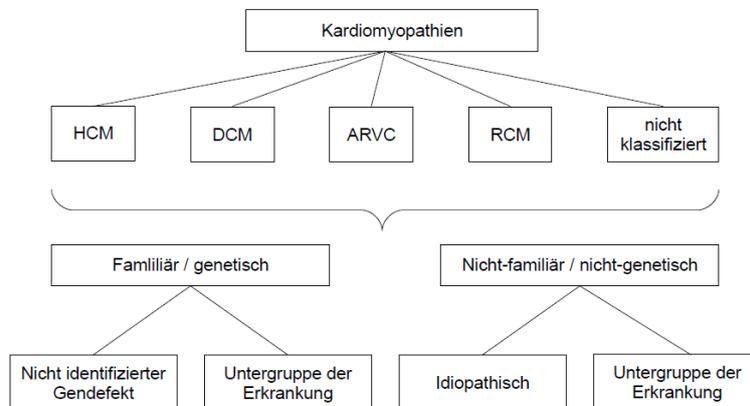


Abbildung 1.2: ESC-Klassifikation der Kardiomyopathien (nach [3]).

Die folgende Arbeit soll sich nun mit den Formen der familiären dilatativen Kardiomyopathie (FDC) befassen. Die dilatative Kardiomyopathie (DCM) ist die häufigste idiopathische Kardiomyopathie. In der US-amerikanischen Bevölkerung beträgt die Prävalenz 36 Fälle auf 100000 Einwohner [4]. Männer sind etwa doppelt so häufig betroffen wie Frauen. Sie ist definiert als Einschränkung der kardialen Pumpfunktion, welche auf eine Dilatation des linken Ventrikels oder beider Ventrikel zurückgeht. Infolgedessen entwickelt sich zunächst eine Linksherzinsuffizienz mit Belastungsdyspnoe und schließlich eine globale Herzinsuffizienz [1].

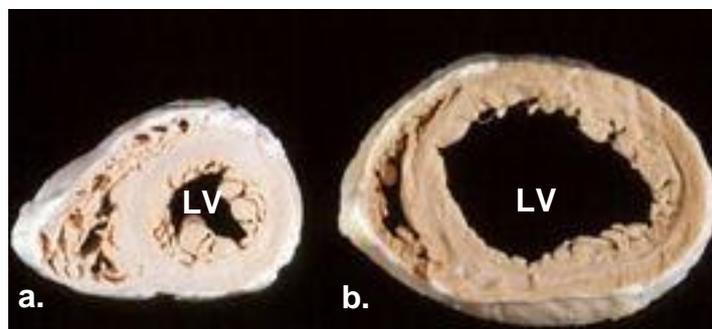


Abbildung 1.3: Schnitte in der Kammerebene des Herzens. a. Normaler Herzmuskel; b. Herzmuskel bei dilatativer Kardiomyopathie; LV = Linker Ventrikel (aus ^b).

^b <http://www.echoincontext.com/2002tele/pathologySupp.asp>

Obendrein besteht bei diesen Patienten ein hohes Risiko für arterielle und pulmonale Embolien sowie für plötzliche Todesfälle durch ventrikuläre Arrhythmien. Mit einer 5-Jahresmortalität von 15 bis 50% handelt es sich hierbei um eine maligne verlaufende Erkrankung. Häufige Ursachen sind Virusinfektionen sowie autoimmune und toxische Schädigungen (allen voran die alkoholtoxische DCM) [1, 5, 6]. Die Tatsache, dass bei etwa der Hälfte aller DCM-Patienten keine Ursache für die Erkrankung gefunden werden kann, lässt eine starke genetische Komponente vermuten. Im Gegensatz zu einer retrospektiven Studie der Mayo-Klinik aus dem Jahre 1981, in der ein FDC-Anteil von 2% angenommen wurde [7], geht man heute davon aus, dass der Anteil an DCM-Erkrankungen mit genetischem Hintergrund zwischen 20 und 50% liegt [8]. Diesbezüglich wurde bereits eine Vielzahl pathogener Mutationen in über 20 Genen beschrieben. Betroffen sind dabei verschiedenste Proteine des Kardiomyozyten – allen voran Lamin A/C, β -Myosin, Troponin T und Dystrophin. Alle anderen als Auslöser bekannten Genmutationen sind relativ selten (siehe Tabelle 1.1) [9].

Lamin A und C sind Intermediärfilamente der Kernlamina, welche ein Teil der Zellkernhülle ist [10]. Mutationen im Lamin A/C Gen können zu einer erhöhten Apoptoserate der am Reizleitungssystem beteiligten Kardiomyozyten führen [11, 12]. Des Weiteren führen LMNA(Lamin A/C)-Mutationen zur Ausbildung einer instabilen Kernlamina, welche durch die mechanische Beanspruchung wiederholter Muskelkontraktionen geschädigt wird [13]. Mutationen in Genen, die für Proteine der kontraktile Einheit des Muskels (Sarkomer) kodieren, führen direkt zu einer Verminderung der Herzmuskelkontraktilität.

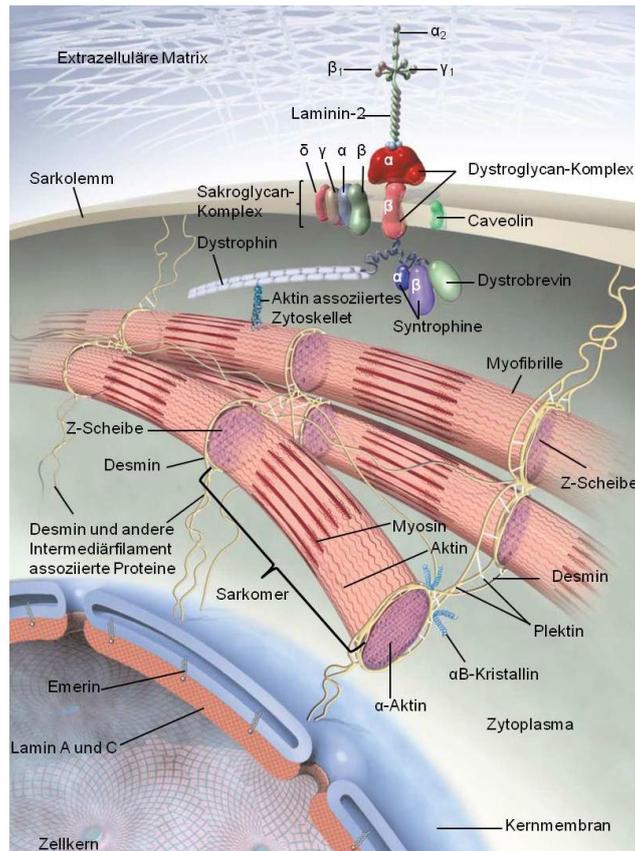


Abbildung 1.4: Darstellung der kontraktilen Elemente der Herzmuskulatur. Dargestellt sind die enge Assoziation der kontraktilen Elemente des Muskels mit Proteinen des Sarkolemm und der Kernhülle sowie einige DCM assoziierte Proteine (vgl. hierzu Tabelle 1.1; Abbildung modifiziert nach [14]).

Grundlage der Muskelkontraktion ist die ATP-abhängige Interaktion zwischen Aktin- und Myosin-Molekülen. Dabei ändern die Kopfgruppen der dicken Myosinfilamente zyklisch ihre räumliche Beziehung zu den dünnen Aktinfilamenten. Dies führt zu einem aneinander Vorbeigleiten der dünnen und dicken Filamente und damit zur Verkürzung des Muskels. Die Bindung zwischen Aktin und Myosin wird maßgeblich durch Tropomyosin und den Troponinkomplex (TnT, TnI, TnC) reguliert, welche durch wechselnde Calcium-Konzentrationen im Cytosol gesteuert werden (siehe Abbildung 1.5) [15].

Veränderungen in der schweren Kette des β -Myosin (β -MHC) resultieren beispielsweise in einer inadäquaten Aktin-Myosin-Bindung, wohingegen Mutationen im Troponinkomplex zu einer verminderten Calcium-Sensitivität und einer Abnahme der Kontraktionsgeschwindigkeit führen [16]. Mutationen im Gen des Tropomyosins äußern sich in einer Beeinträchtigung der elektrostatischen Wechselwirkungen zum Aktinmolekül [17].

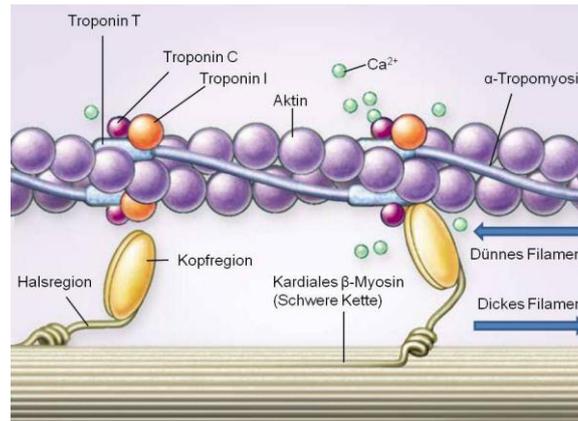


Abbildung 1.5: Krafterzeugung im Sarkomer durch Aktin-Myosin-Wechselwirkungen. Verantwortlich für die Muskelkontraktion ist die repetitive Bindung des Myosinkopfes an das Aktinmolekül. Gesteuert wird dieser dynamische Vorgang durch die Calcium-Konzentration im Zytoplasma. Eine Konformationsänderung der Halsregion des Myosins bewirkt dabei nach Bindung des Aktins ein aneinander Vorbeigleiten der Aktin- und Myosinfilamente. ATP-abhängig kann sich das Myosinköpfchen wieder vom Aktin lösen und der Vorgang beginnt von vorne [15] (modifiziert nach [18]).

Neben den isolierten Formen tritt die DCM auch in Kombinationen mit skelettalen Muskeldystrophien vom Typ Becker und Duchenne sowie mit der Emery-Dreifuss-Muskeldystrophie auf. Sie ist jedoch auch mit verschiedenen Syndromen assoziiert, die nicht die Muskulatur betreffen wie beispielsweise mit der Hereditären Hämochromatose oder dem Barth-Syndrom. In den meisten Fällen ist der Erbgang autosomal-dominant, aber auch x-chromosomale und autosomal-rezessive Vererbungen sind beschrieben (siehe Tabelle 1.1).

Gen	Lokus	OMIM	Genprodukt	Assoziierte Erkrankungen
Autosomal-dominante DCM				
LMNA	1q21.2	150330	Lamin A/C	Lipodystrophie, Charcot-Marie-Tooth, Emery-Dreifuss –Muskeldystrophie, Hutchinson-Gilford Syndrom, Gliedergürtel- Muskeldystrophie 1B
MYH7	14q12	160760	β-Myosin	Distale Myopathie „Laing“, HCM
TNNT2	1q32	191045	Kardiales Troponin T	HCM
SCN5A	3p21	600163	Natriumkanal	Long QT Syndrom, Brugada Syndrome, Idiopathisches Kammerflimmern, Sick sinus Syndrom, Kardiale Reizleitungsstörungen
MYH6	14q12	160710	α-Myosin	HCM, Vorhofseptumdefekt
DES	2q35	125660	Desmin	Desminopathie, Myofibrilläre Myopathie
VCL	10q22.1-23	193065	Metavinculin	HCM
LDB3	10q22.2- 23.3	605906	LIM Bindungsdomäne 3	HCM, Myofibrilläre Myopathie
TCAP	17q12	604488	Titin-Cap/Telethonin	Telethoninopathie, HCM
PSEN1/ PSEN2	14q24.3/ 1q31-q42	104311/ 600759	Presenilin 1/2	Early- und late-onset M. Alzheimer
ACTC	15q14	102540	Kardiales Aktin	HCM
TPM1	15q22.1	191010	α –Tropomyosin 1	HCM
SGCD	5q33–34	601411	δ-Sarkoglycan	Gliedergürtel-Muskeldystrophie 2F
CSRP3	11p15.1	600824	Muskel LIM Protein	HCM
ACTN2	1q42-q43	102573	α-Aktinin-2	HCM
ABCC9	12p12.1	601439	SUR2A Untereinheit kardialer K ⁺ -ATP-Kanal	Unbekannt
TNNC1	3p21.3- p14.3	191040	Kardiales Troponin C	Unbekannt
TTN	2q31	188840	Titin	Distale Myopathie „Udd“, HCM, Edström Myopathie, Early onset myopathy with fatal cardiomyopathy
MYBPC3	11p11.2	600958	Myosin-Bindungsprotein C	HCM
PLN	6q22.1	172405	Phospholamban	HCM
EYA4	6q23	603550	Eyes-absent 4	Unbekannt
TMPO	12q22	188380	Thymopoetin	Unbekannt

X-chromosomale DCM

DMD	Xp21.2	300377	Dystrophin	Muskeldystrophie Typ Duchenne und Becker
TAZ/G4.5	Xq28	300394	Tafazzin	Barth Syndrom, Endokardfibroelastose Typ 2, Isolierte Noncompaction-Kardiomyopathie

Autosomal-rezessive DCM

TNNI3	19q13.4	191044	Kardiales Troponin I	HCM, RCM
-------	---------	--------	----------------------	----------

Tabelle 1.1: DCM assoziierte Mutationen (modifiziert nach [19]).

Den Schweregrad der klinischen Manifestation betreffend bestehen selbst bei gleicher Genkonstellation ausgeprägte interindividuelle Unterschiede, sodass aufgrund der Genetik des Patienten keine Aussage über den klinischen Verlauf getroffen werden kann [20]. Wenn jedoch bei einem Patienten eine Mutation als Ursache der Erkrankung identifiziert wird, so wäre es möglich asymptotische Familienangehörige auf diese Mutation hin zu untersuchen. Damit könnten Träger des Gendefektes schon vor dem Auftreten erster Symptome behandelt werden, was den Verlauf der Erkrankung positiv beeinflussen könnte. Das wäre insbesondere bei Trägern von Mutationen im LMNA-Gen sinnvoll, da gerade diese Patienten zu ventrikulären Arrhythmien neigen und ein erhöhtes Risiko für einen plötzlichen Herztod aufweisen [21].

1.2 Entdeckung einer neuen DCM-Mutation

Am Institut für Klinische Biochemie und Pathobiochemie der Universität Würzburg konnte durch die Arbeitsgruppe Zimmer eine bisher nicht bekannte Mutation als Auslöser einer familiären dilatativen Kardiomyopathie beschrieben werden. Die Erkrankung ließ sich über drei Generationen in einer portugiesischen Familie nachvollziehen, wobei 16 Familienmitglieder betroffen waren. Stammbaumanalysen ließen auf einen autosomal-dominanten Erbgang schließen. Mit Hilfe einer genomweiten Kopplungsanalyse konnten Verbindungen zu sämtlichen bekannten DCM-Genen ausgeschlossen werden. Die Mutation wurde schließlich auf einen 9,73 Mb (Megabasen) großen Bereich auf Chromosom 7q22.3-31.1 eingegrenzt [22]. Sequenzanalysen zeigten, dass

sich die Mutation im DLD-Gen befindet, welches für das mitochondriale Enzym Dihydrolipoamid-Dehydrogenase kodiert. Es handelte sich um eine Basenaustauschmutation von Adenin zu Guanin an Position 100 (Nummerierung ausgehend vom Startkodon ATG, NM000108) in Exon 2 des DLD-Gens. Diese Mutation bewirkte einen Austausch der Aminosäure Threonin durch die Aminosäure Alanin an Position 34 des Proteins. Damit wurde die vorletzte Aminosäure des Signalpeptids der Dihydrolipoamid-Dehydrogenase verändert [23]. Signalpeptide sind unerlässlich für den Import von zyttoplasmatisch translatierten Proteinen ins Innere der Mitochondrien [24]. Daher wurde zunächst geklärt, ob der mitochondriale Import der DLD durch die Mutation behindert wird. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass sowohl der Transport, als auch die Prozessierung des Signalpeptides ungehindert stattfinden. Die Enzymaktivität der mutierten Dihydrolipoamid-Dehydrogenase in Lymphozyten lag ebenfalls im Normbereich [23].

Möglicherweise steht der Pathomechanismus in Zusammenhang mit dem Abbau des Signalpeptids durch mitochondriale Metallo-Endoproteasen. Es konnte gezeigt werden, dass die mutierte Variante des Signalpeptids einer schnelleren Degradation unterlag als die Wildtyp-Variante [25].

1.3 Die Dihydrolipoamid-Dehydrogenase

Das Gen der Dihydrolipoamid-Dehydrogenase (DLD; E3) umfasst 14 Exons und ist mit einer Länge von etwa 20 kb (Kilobasen) auf Chromosom 7q31.1-7q32 lokalisiert [26, 27]. Seine mRNA misst 1527 bp und kodiert für ein etwa 55 kDa (Kilodalton) großes Protein [28]. Das Protein gehört zur Familie der Pyridin-Nukleotid-Disulfid-Oxidoreduktasen (EC 1.8.1.4) [29]. In ihrer aktiven Form bildet die DLD ein Homodimer mit jeweils einem reaktiven Disulfid und einem nicht-kovalent gebundenen FAD-Molekül (Flavin-Adenin-Dinukleotid) als Co-Faktor [28]. Als solches ist sie Teil von vier mitochondrialen Multienzymkomplexen, die eine wichtige Rolle im Energie- und Aminosäurestoffwechsel spielen (siehe Abbildung 1.6).

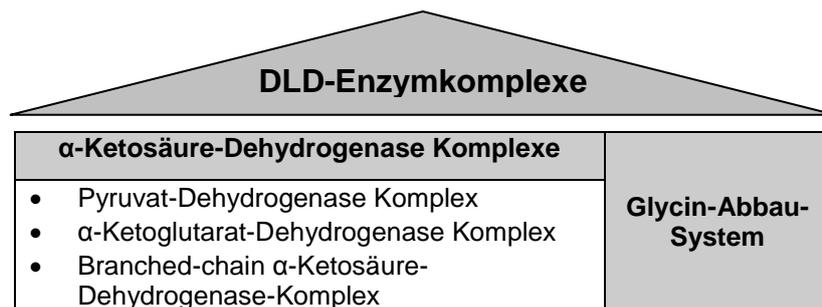


Abbildung 1.6: DLD-Enzymkomplexe. Die Dihydrolipoamid-Dehydrogenase befindet sich als Untereinheit in der Gruppe der α -Ketosäure-Dehydrogenase Komplexe [27] sowie im Glycin-Abbau-System[29].

Die α -Ketosäure-Dehydrogenase-Komplexe bestehen aus drei Untereinheiten: der α -Ketosäure-Dehydrogenase (E1), der Dihydrolipoamid-Acyltransferase (E2) und der Dihydrolipoamid-Dehydrogenase (E3). E1 und E2 sind substratspezifisch und daher je nach Enzymkomplex, in dem sie vorkommen auf separaten Genen kodiert. Für E3 gibt es nur ein einziges Gen. [28]. Das Glycin-Abbau-System ist aus vier Proteinen zusammengesetzt – dem P-, H-, T-, und L-Protein – und für die Degradation von Glycin verantwortlich. Die Dihydrolipoamid-Dehydrogenase stellt das L-Protein in diesem Komplex dar [30].

1.4 Mutationen im Gen der DLD

Bisher sind lediglich 13 pathogene Mutationen im DLD-Gen beschrieben (siehe Tabelle 1.2). Auslöser für dilatative Kardiomyopathien sind bisher nicht darunter. Es sind jedoch Fälle bekannt, bei denen eine mutationsbedingte E3-Defizienz zur Entwicklung einer frühkindlichen Hypertrophen Kardiomyopathie führte [31, 32]. In allen bisher beschriebenen Fällen einer E3-Defizienz sind beide Allele der DLD betroffen. Dabei handelt es sich meistens um eine *Compound Heterozygotie*. Das heißt, die beiden Allele sind von jeweils zwei unterschiedlichen pathogenen Mutationen betroffen [33]. Die klinischen Erscheinungsbilder einer E3-Defizienz sind sehr heterogen. Sie äußern sich jedoch typischerweise in Form von mentaler Entwicklungsverzögerung und frühkindlich auftretenden neurologischen Symptomen wie spastischen Bewegungsstörungen, Muskelschwäche und Krampfanfällen. Laborchemisch finden sich oft eine Laktatazidose, eine Pyruvatakkumulation im Plasma sowie

erhöhte α -Ketosäure-Spiegel im Urin [31-38]. Darüber hinaus ist die E3-Defizienz als Variante der Ahornsirupkrankheit (MSUD = *maple syrup urine disease*) bekannt [35]. Es wurden jedoch auch schon Patienten beschrieben, bei denen weder eine erhöhte Plasmakonzentration an Pyruvat noch ein erhöhter α -Ketosäure-Spiegel im Urin nachgewiesen werden konnte [31]. Bemerkenswerterweise wurden auch Patienten mit E3-Defizienz beschrieben, bei deren Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex keine Aktivitätsminderung nachweisbar war [34].

DNA-Ebene	Protein-Ebene	Proteindomäne	Klinik	Kommentar	Referenz
c.214A>G (Exon 4)	p.K72E	FAD-Bindungsdomäne	MSUD, Neurologische Defekte	Compound	[35]
c.1463C>T (Exon 13)	p.P488L	Dimerisation		Heterozygotie	
c.104_105insA (Exon 2)	p.Y35X	Signalpeptid	MSUD, Entwicklungsstörungen,	Compound	[36]
c.1483A>G (Exon 14)	p.R495G	Dimerisation	Hypotonie, Laktatazidose	Heterozygotie	
c.405_407delAGG (Exon 6)	p.G136del	FAD-Bindungsdomäne	Krampfanfälle, Hypoglycämie,	Compound	[37]
c.1123G>A (Exon 11)	p.E375K	Aktives Zentrum	Hepatomegalie, Azidose	Heterozygotie	
c.104_105insA (Exon 2)	p.Y35X	Signalpeptid	MSUD, Neurologische Defekte,	Compound	[38]
c.685G>T (Exon 9)	p.G229C	NAD-Bindungsdomäne	Enzephalopathie, Muskelhypotonie	Heterozygotie	
c.685G>T (Exon 9)	p.G229C	NAD-Bindungsdomäne	Fatigue, Multiorganversagen,	Homozygotie	[38]
c.685G>T (Exon 9)	p.G229C		Metabolische Azidose		
c.1436A>T (Exon 13)	p.D479V	Dimerisation	Hypertrophe Kardiomyopathie,	Homozygotie	[32]
c.1436A>T (Exon 13)	p.D479V		Hypotonie, Mikrozephalie, Azidose		
c.1123G>A (Exon 11)	p.E375K	Aktives Zentrum	MSUD, Hypotonie, Laktatazidose	Homozygotie	[39]
c.1081A>G (Exon 11)	p.M361V				
c.1178T>C (Exon 11)	p.I393T	Dimerisation	Leigh-Syndrom, Hypoglycämie,	Compound	[33]
g.IVS9+1G>A (Intron 9)	Nicht vorhanden		Azidose, Mikrozephalie	Heterozygotie	
c.1444A>G (Exon 13)	p.R482G	Dimerisation	Hypertrophe Kardiomyopathie,	Homozygotie	[31]
c.1444A>G (Exon 13)	p.R482G		Hypotonie, Kortikale Atrophie		
c.140T>C (Exon 3)	p.I47T	FAD-Bindungsdomäne	Mikrozephalie, Hypotonie,	Compound	[34]
c.1123G>A (Exon 11)	p.E375K	Aktives Zentrum	Laktatazidose	Heterozygotie	
c.140T>C (Exon 3)	p.I47T	FAD-Bindungsdomäne	Metabolische Azidose, Krampfanfälle,	Compound	[34]
c.685G>T (Exon 9)	p.G229C	NAD-Bindungsdomäne	Herzinsuffizienz	Heterozygotie	

Tabelle 1.2: Mutationen im DLD-Gen. **DNA-Ebene:** *NCBI Reference Sequence NM_000108.3*, Nummerierung beginnend mit dem Nukleotid A des Startkodons ATG (bezogen auf cDNA); **Protein-Ebene:** *NCBI Reference Sequence NP_000099.2*, Nummerierung beginnend mit der ersten Aminosäure (Methionin) des unprozessierten Proteins; MSUD = maple syrup urine disease. (aus [23, 34] [31])

1.5 Einführung in die Denaturing High-Performance Liquid Chromatography

Eine ausgezeichnete Möglichkeit zur Detektion von DNA-Mutationen ist die *Denaturing High-Performance Liquid Chromatography* (DHPLC; dt.: Denaturierende Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie). Dabei handelt es sich um ein chromatographisches Verfahren zur Trennung von Homo- und Heteroduplexen [40], wodurch es ermöglicht wird heterozygote Veränderungen in der Erbsubstanz nachzuweisen.

Ein nativer DNA-Doppelstrang – also ein Doppelstrang mit einer typischen Watson-Crick Basenpaarung (Adenin/Thymin bzw. Guanin/Cytosin) – wird in diesem Zusammenhang als Homoduplex bezeichnet. Verbinden sich nun die Einzelstränge eines Wildtyp-Allels mit denen eines mutierten Allels, so entstehen zwei Doppelstränge, die an einer Stelle keine typische Watson-Crick Basenpaarung mehr aufweisen. Diese Konstellation, wie sie in der folgenden Abbildung dargestellt ist, bezeichnet man als Heteroduplex.

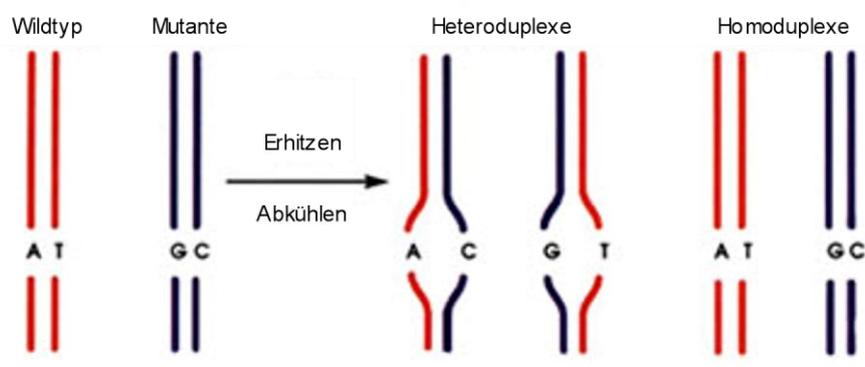


Abbildung 1.7: Entstehung von Heteroduplexen. Nach dem Denaturierungs-/Renaturierungsschritt haben sich beim Vorhandensein einer heterozygoten Mutation Homo- und Heteroduplexe zu gleichen Teilen gebildet (aus^c).

Um die Entstehung von Heteroduplexen zu begünstigen wurden die PCR-Produkte vor Beginn der DHPLC-Analyse zunächst durch Hitze denaturiert und danach wieder abgekühlt. Während der Abkühlungsphase formten sich nach dem Zufallsprinzip wieder neue Doppelstränge. Sollte sich

^c <http://www.tint.or.th/nkc/nkc52/nstkc009.html>

also eine heterozygote Mutation im untersuchten PCR-Produkt befunden haben, entstanden dabei Homo- und Heteroduplexe zu gleichen Teilen, also je zwei Homo- und zwei Heteroduplexe.

Wie eingangs erwähnt, handelt es sich bei der DHPLC um ein chromatographisches Verfahren. Die stationäre Phase befindet sich dabei in einer Säule und besteht aus Polystyrol-Divinylbenzol(PS-DVB)-Kügelchen, die mit C-18 Ketten alkyliert sind. Bei der mobilen Phase handelt es sich um eine Kombination zweier Puffer. Puffer A enthält Triethylammoniumacetat (TEAA) und ist dafür verantwortlich die Verbindung zwischen den DNA-Fragmenten und der Säule herzustellen. Die Ethylgruppen der Triethylammonium-Ionen binden dazu an die hydrophoben C18-Ketten der PS-DVB-Matrix, wohingegen der positiv geladene Ammoniumanteil an das negativ geladene Zucker-Phosphat-Rückgrat der DNA bindet (siehe Abb. 1.8).

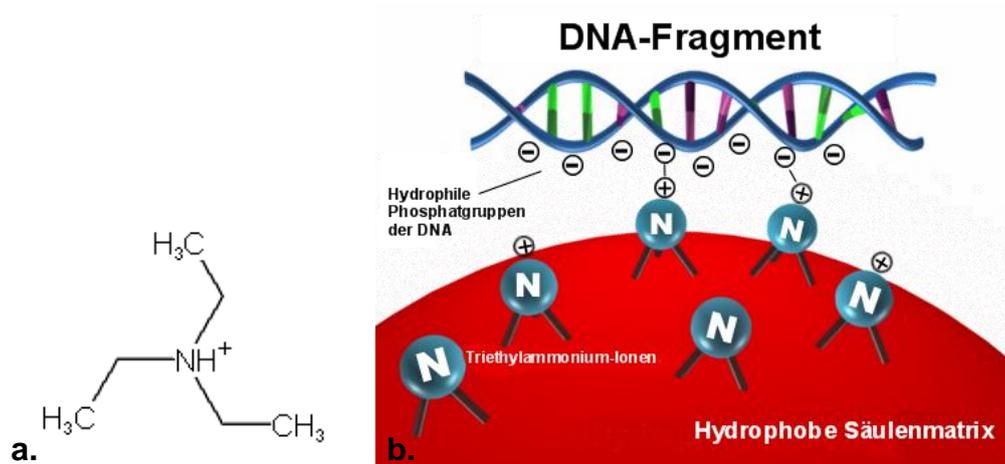


Abbildung 1.8: Interaktion zwischen DNA und Säulenmatrix. a. Triethylammonium-Ion b. Die Triethylammonium-Ionen vermitteln die Bindung der hydrophilen Phosphatgruppen der DNA-Fragmente an die hydrophoben C-18-Ketten der Säulenmatrix (b. modifiziert nach^d).

Puffer B ist eine 25%ige Acetonitril-Lösung und dient dazu die DNA-Fragmente wieder von der Säule zu lösen. Erreicht wird das durch eine stetige Erhöhung der Acetonitrilkonzentration im Puffergemisch während der laufenden Messung, wodurch die Wechselwirkungen zwischen Säule und TEAA wieder gelöst werden. Der Acetonitrilgradient wird mithilfe einer Software automatisch gesteuert.

^d <http://www.transgenomic.com/pd/Systems.asp?tab=2>

Um nun Homo- und Heteroduplexe voneinander zu trennen macht man sich deren unterschiedliche Schmelztemperaturen zunutze. Die Denaturierung von Heteroduplexen beginnt bereits bei Temperaturen, bei denen Homoduplexe noch intakt bleiben. Das heißt also, während Homoduplexe noch als intakte Doppelstränge vorliegen, bekommen die Heteroduplexe bereits eine einzelsträngige Komponente. Ein Grund dafür ist die inkomplette Basenpaarung der Heteroduplexe [41]. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die thermische Stabilität eines Heteroduplexes nicht einzig und allein von den Interaktionen der korrespondierenden Basen abhängt, sondern ebenfalls von der die Stelle des Basenaustausches flankierenden Sequenz beeinflusst wird [42].

Zur Trennung von Homo- und Heteroduplexen nutzt man nun den Umstand, dass einzelsträngige DNA schwächer an die Chromatographiesäule bindet als doppelsträngige. Wählt man also eine Umgebungstemperatur, bei der Heteroduplexe bereits teilweise denaturieren, während Homoduplexe noch intakt bleiben, so ist die Passagegeschwindigkeit der Heteroduplexe aufgrund ihrer einzelsträngigen Komponente höher als die der Homoduplexe [40, 43]. Um das umzusetzen befindet sich die Chromatographiesäule in einer Kammer, deren Innentemperatur regulierbar ist.

Die Schmelztemperatur eines doppelsträngigen DNA-Abschnittes hängt unter anderem davon ab, in welchem Verhältnis die Basenpaare Adenin/Thymidin (A/T) bzw. Guanin/Cytosin (G/C) im Strang verteilt sind. G/C-reiche Abschnitte sind thermisch stabiler, da die Basenpaarung von Guanin und Cytosin von drei Wasserstoffbrückenbindungen stabilisiert wird, während sich zwischen Adenin und Thymidin nur zwei Wasserstoffbrückenbindungen ausbilden [41]. Ein weiterer wichtiger Faktor, der zur Stabilität der DNA-Doppelhelix beiträgt, ist die Wirkung von Stapelwechselwirkungen zwischen benachbarten Basen [44]. Da also die Schmelztemperatur eines Doppelstranges von seiner Basensequenz abhängt, muss sie für jede zu untersuchende Probe neu berechnet werden (siehe Abschnitt 2.3.2 Einstellung der Schmelzprofile). Nach dem Durchlaufen der Chromatographiesäule werden

die DNA-Fragmente schließlich von einem UV-Absorptions-Detektor registriert und mittels einer Software in ein Chromatogramm umgewandelt.

Befinden sich nur Homoduplexe in der untersuchten Probe – und damit keine heterozygote Mutation – wird im Idealfall nur ein einzelner Peak angezeigt (siehe Abbildung 1.9).

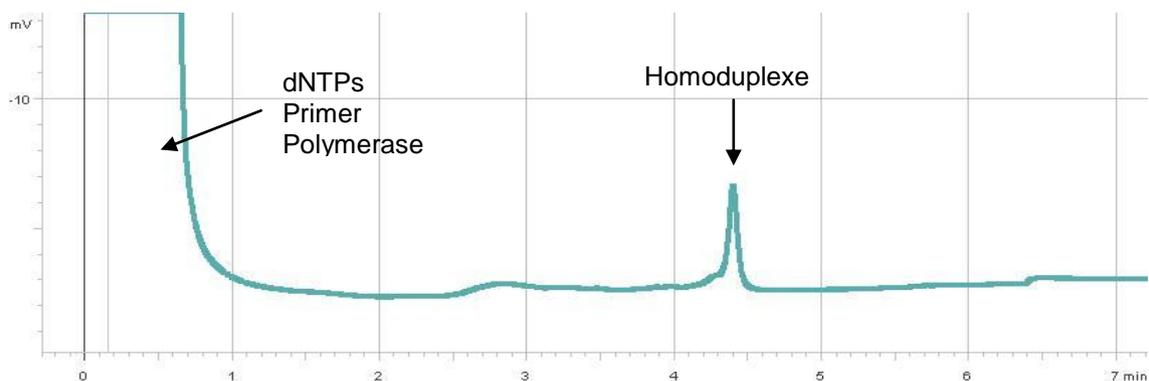


Abbildung 1.9: Chromatogramm eines Homoduplexes. Der große Peak zu Beginn des Chromatogramms wird durch unverbrauchte dNTPs, Primer und die Polymerase hervorgerufen (gleiches gilt für Abbildung 1.10). Der folgende Einzelpeak zeigt die Detektion eines Homoduplexes an. x-Achse: Dauer der Messung in Minuten. y-Achse: Höhe des Messausschlags in Milli-Volt.

Sollte sich eine heterozygote Mutation in der Probe befinden, müssen die Chromatogramme differenzierter betrachtet werden. Werden zwei annähernd gleichgroße Peaks angezeigt, so sind diese meist repräsentativ für je ein Homo- und ein Heteroduplexpaar. Da jedoch während des Denaturierungs-/Renaturierungsschritts insgesamt vier unterschiedliche Doppelstränge entstehen, die sich alle in ihren Passagegeschwindigkeiten unterscheiden können, ist es auch möglich, dass bis zu vier Peaks angezeigt werden (siehe Abbildung 1.10).

Dieses Schema reicht jedoch nicht immer aus um mutierte DNA-Proben von nicht mutierten zu unterscheiden. Gelegentlich kommt es vor, dass auch im Chromatogramm nicht mutierter Proben mehr als ein Peak erkennbar ist (siehe hierzu: 4.2 Bedeutung zusätzlicher Peaks in Abwesenheit einer Mutation).

Daher ist es wichtig die Proben einer Messreihe untereinander zu vergleichen. Ist beispielsweise in allen Chromatogrammen ein gleichförmiger zusätzlicher Peak erkennbar, so ist das Vorhandensein einer Mutation unwahrscheinlich, sollte jedoch durch Sequenzieren einiger PCR-Produkte überprüft werden.

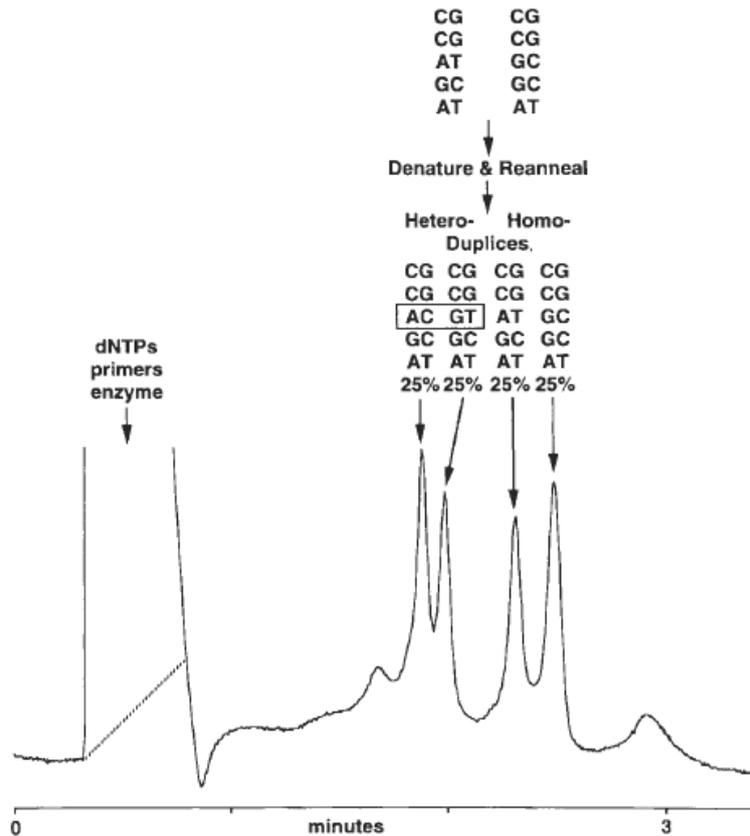


Abbildung 1.10: Chromatogramm mit Homo- und Heteroduplexen. Die vier separaten Peaks sind repräsentativ für je zwei Homo- und zwei Heteroduplexe (aus [43]).

1.6 Das HapMap Projekt

Eine besondere Rolle bei der Betrachtung von Erbgutveränderungen spielen die sogenannten SNPs (*single nucleotide polymorphisms*; dt.: Einzelnukleotid-Polymorphismen). Es handelt sich dabei um einzelne Basenaustausch-Mutationen mit einer Frequenz von mehr als 1% in der Bevölkerung [45]. Für ein besseres Verständnis der Auswirkungen solcher Polymorphismen schlossen sich im Oktober 2002 Forschergruppen aus sechs verschiedenen

Ländern zum sogenannten *HapMap* Konsortium zusammen. Dieses Konsortium setzte sich zum Ziel sowohl bekannte, als auch bisher nicht beschriebene Sequenzvariationen des menschlichen Erbguts zu erfassen und somit eine genomweite Haplotypenkarte zu erstellen. Untersucht wurden dabei die Häufigkeitsverteilung von SNPs sowie deren Verteilung und Assoziation untereinander. Die gesammelten Daten sollen unter anderem Aufschluss darüber geben, inwiefern Sequenzvarianten die Suszeptibilität für häufige Volkskrankheiten, Medikamentenwirkungen und Umweltfaktoren beeinflussen können [46].

Ursprünglich wurden dazu 270 DNA-Proben aus vier unterschiedlichen Populationen untersucht. 90 Proben stammten von US-Bürgern mit nord- und westeuropäischen Vorfahren, weitere 90 aus dem Volk der Yoruba in Nigeria, 45 Proben kamen von Japanern aus Tokyo und weitere 45 von Han Chinesen aus Peking. In Phase I und II des Projektes wurden somit insgesamt 3,1 Millionen SNPs charakterisiert, was in etwa 25-30% der geschätzten Gesamtzahl von 9-10 Millionen SNPs des menschlichen Genoms entspricht [47]. Aufbauend auf den Ergebnissen aus Phase I und II erweiterten britische und US-amerikanische Forscher den Datensatz durch die Untersuchung weiterer Proben der ursprünglichen Populationen sowie durch die Genotypisierung von 1,6 Millionen SNPs aus sieben zusätzlichen Populationen (*HapMap3*)^{e,f}. Sämtliche Ergebnisse werden ständig auf der Internetseite des *International HapMap Project* (<http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/>) aktualisiert und sind darüber hinaus mit der *NCBI SNP Database*^g verknüpft.

^e <http://ccr.coriell.org/Sections/Collections/NHGRI/hapmap.aspx?PgId=266&coll=HG>

^f <http://www.hgsc.bcm.tmc.edu/project-medseq-hm-hapmap3encode3.hgsc?pageLocation=hapmap3encode3>

^g <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/index.html>

1.7 Zielsetzung der Arbeit

Durch die Entdeckung einer neuen DCM-Mutation im Gen der Dihydrolipoamid-Dehydrogenase ergaben sich Hinweise für eine Assoziation dieses Gens mit der Entwicklung einer dilatativen Kardiomyopathie. Bisher liegen jedoch keine Daten vor, die die Häufigkeit DCM assoziierter Mutationen im DLD-Gen beschreiben. Mit der Klärung dieser Fragestellung befasst sich die vorliegende Arbeit. Dazu wurden DCM-Patienten, die erwiesenermaßen an einer familiären Form dieser Erkrankung leiden, gezielt auf Veränderungen in den Exons des DLD-Gens untersucht. Somit sollten weitere Zusammenhänge zwischen genetischen Alterationen im DLD-Gen und dem Auftreten einer dilatativen Kardiomyopathie aufgedeckt werden. Hierfür wurden die einzelnen Exons der Dihydrolipoamid-Dehydrogenase mittels PCR (*polymerase chain reaction*; dt.: Polymerase-Kettenreaktion) amplifiziert. Anschließend wurden die so gewonnenen PCR-Produkte mit Hilfe der DHPLC (*Denaturing High-Performance Liquid Chromatography*; dt.: Denaturierende Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie) auf das Vorhandensein von Mutationen durchsucht. Dabei handelt es sich um ein chromatographisches Verfahren zur Auftrennung von Nukleinsäuren, durch welches ein hochempfindlicher und gleichermaßen äußerst spezifischer Nachweis heterozygoter DNA-Veränderungen möglich ist. Die besten Ergebnisse liefert diese Methode bei der Untersuchung von DNA-Fragmenten, deren Größe zwischen 150 und 700 bp (Basenpaare) liegt [43, 48-50]. Somit war dieses Verfahren bestens geeignet für die Untersuchung der DLD-Exons, deren Fragmentgröße zwischen 227 und 505 bp lag. Detektierte Mutationen wurden anschließend mittels Sequenzierung der betroffenen PCR-Produkte bestätigt. Zur Einordnung und Klassifizierung der Erbgutveränderungen sowie zur Abklärung einer möglichen pathogenen Relevanz wurden alle nachgewiesenen Mutationen mit den Daten des *Ensembl Genome Browser*^h, der *NCBI SNP Database*ⁱ, der *Allele Frequency Database*^j und des *HapMap* Projektes^k abgeglichen.

^h http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Summary?g=ENSG00000091140

ⁱ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/index.html>

^j <http://alfred.med.yale.edu>

^k <http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/>

2 Methoden und Material

2.1 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR; *polymerase chain reaction*) ist eine Methode zur Amplifikation von Nukleinsäuren. Der Biochemiker Kary B. Mullis entwickelte im Jahr 1983 somit eine Kettenreaktion, mit der es von nun an möglich war bestimmte Zielsequenzen aus dem Erbgut mit Hilfe von bakteriellen Polymerasen zu vervielfältigen [51].

2.1.1 Ablauf einer Polymerase-Kettenreaktion

Das Reaktionsgemisch für eine PCR beinhaltet im Wesentlichen folgende Inhaltsstoffe: genomische DNA, zwei kurze DNA-Stücke (Primer), die dem jeweiligen 3'-Ende der zu amplifizierenden Sequenz komplementär sind, Nukleotide (dNTPs), eine bakterielle Polymerase sowie $MgCl_2$ und einen geeigneten Reaktionspuffer.

Der erste Schritt der Reaktion ist die Erhitzung des Gemisches auf etwa $95^\circ C$. Dadurch wird der Doppelstrang der genomischen DNA in zwei Einzelstränge denaturiert. Danach müssen sich die Primer an ihre Zielsequenz anlagern. Bei den Primern handelt es sich um künstlich hergestellte Oligonukleotide, deren Basensequenz genau so konzipiert ist, dass sie die Sequenz flankieren, die amplifiziert werden soll. Zur Anlagerung der Oligonukleotide (Annealing) muss die Temperatur des Reaktionsgemisches auf etwa $50-60^\circ C$ abgekühlt werden. Die Höhe der Annealingtemperatur ist abhängig von der Schmelztemperatur der verwendeten Primer (Temperatur, bei der sich die Primer wieder von ihrer Zielsequenz lösen) und sollte etwa $5^\circ C$ unter dieser liegen. Im Anschluss an das Primerannealing nutzt die bakterielle Polymerase die angelagerten Primer als Ausgangspunkt um die Einzelstränge wieder zu Doppelsträngen zu ergänzen (Elongation). Die optimale Temperatur für diese Reaktion hängt von der verwendeten Polymerase ab und lag in diesem Fall bei $72^\circ C$. Der eben beschriebene Zyklus wird nun 30 bis 40-mal wiederholt. Da die synthetisierten Doppelstränge für jeden neuen Zyklus selbst

als Matrizen dienen, steigt der Anteil an amplifizierter Zielsequenz so bei jedem Durchgang exponentiell an [15, 51].

Da die PCR-Produkte dem Mutationsscreening dienen sollten, wurde eine spezielle Form der PCR gewählt. Diese vervielfältigte die gewünschten DNA-Fragmente mit besonders hoher Spezifität. Das verwendete Verfahren wird als *Touch Down PCR* bezeichnet [52].

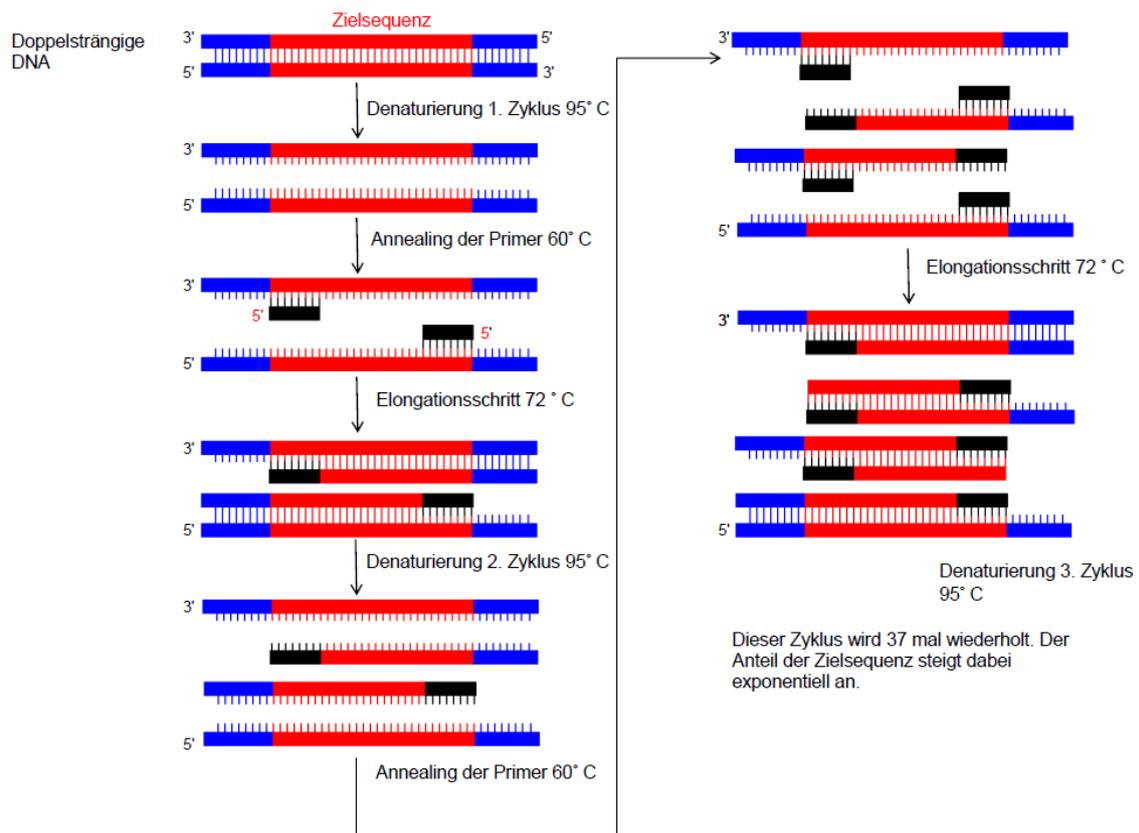


Abbildung 2.1: Schematische Darstellung der ersten beiden Zyklen einer PCR.

2.1.2 Besonderheiten der Touch Down PCR

Die *Touch Down PCR* unterscheidet sich von der konventionellen PCR insofern, dass im ersten Zyklus eine Annealingtemperatur gewählt wird, die über der errechneten Schmelztemperatur der verwendeten Primer liegt (siehe Abschnitt 2.1.3 Einzelschritte im Detail). In der hier beschriebenen PCR betrug sie 60°C. In jedem zweiten der folgenden Zyklen wurde sie um 1°C abgesenkt, bis sie 55°C erreichte. In allen weiteren Zyklen wurde dann diese

Annealingtemperatur verwendet. Die Anlagerung der Primer ist bei Temperaturen, die über beziehungsweise nahe an ihrem Schmelzpunkt liegen, hochspezifisch. Damit wurde erreicht, dass in den ersten Zyklen der PCR ausschließlich die Zielsequenz amplifiziert wurde. Die Temperatur in den darauf folgenden Zyklen lag etwa 3 bis 5°C unter der Schmelztemperatur der Primer. Das war notwendig um eine sichere Primerbindung und damit eine reibungslose Kettenreaktion zu gewährleisten. Daraus resultierte zwar eine höhere Wahrscheinlichkeit der Fehlanlagerung der Primer, was aber dadurch kompensiert wurde, dass größtenteils die hochspezifischen PCR-Produkte aus den ersten Zyklen als Matrizen dienten [53]. Um die Spezifität der PCR noch weiter zu erhöhen, wurde zusätzlich eine *Hotstart* Polymerase (*Solis Biodyne HOT FIREPoI[®]*) verwendet. Diese Polymerase wird solange durch einen Antikörper inhibiert, bis dieser durch Hitze denaturiert wird. Daher wurde jeder PCR eine 15 min dauernde Erhitzung auf 95°C vorgeschaltet, wodurch die Polymerase erst zu Beginn der PCR aktiv wurde. Dadurch konnte die Entstehung unspezifischer Produkte vermieden werden.

2.1.3 Einzelschritte im Detail

Zur Schonung der verwendeten Reagenzien wurden sämtliche Pipettierschritte auf Eis durchgeführt. Zuerst erfolgte die Herstellung des Mastermix. Dabei wurden sämtliche in der unten stehenden Liste aufgeführten Reagenzien (bis auf die Patienten-DNA) in ein *Eppendorf-Reaktionsgefäß* pipettiert. Nach kurzer Durchmischung mittels *Vortex-Mixer* wurde das Mastermix in Einzelportionen à 50µl auf die einzelnen PCR-Gefäße verteilt um abschließend noch durch das Hinzufügen der jeweiligen Patienten-DNA komplettiert zu werden. Zur Durchführung der PCR wurden die Gefäße in den *Biometra PCR Thermocycler T1* überführt, welcher die notwendigen Reaktionstemperaturen erzeugte. Die erfolgreiche Amplifikation wurde anschließend mittels Agarose-Gelelektrophorese überprüft. Das verwendete PCR-Programm sowie die Konzentrationen der Reagenzien sind den folgenden Tabellen zu entnehmen.

Programm der *Touch Down* PCR

1. 95°C 15min	(Aktivierung)		11. 95°C 30s	
2. 95°C 30s	(Denaturierung)		12. 57°C 30s	
3. 60°C 30s	(Annealing)		13. 72°C 1min30s	11-13: 2x
4. 72°C 1min30s	(Elongation)	2-4: 2x	14. 95°C 30s	
5. 95°C 30s			15. 56°C 30s	
6. 59°C 30s			16. 72°C 1min30s	14-16: 2x
7. 72°C 1min30s		5-7: 2x	17. 95°C 30s	
8. 95°C 30s			18. 55°C 30s	
9. 58°C 30s			19. 72°C 1min30s	17-19: 32x
10. 72°C 1min30s		8-10: 2x	20. 72°C 10min	

PCR-Reaktionsgemisch (50 µl)

1x Puffer BD (Solis Biodyne)
1,5 mmol MgCl₂ (Solis Biodyne)
0,04 mmol dNTP-Mix (Fermentas)
2,5 U HotFire Polymerase (Solis Biodyne)
0,2 µmol je Primer (Metabion)
40 ng genomische DNA

2.1.4 Primerdesign

Um eine funktionierende PCR gewährleisten zu können muss bei der Auswahl der Primer auf verschiedene Qualitätsmerkmale Rücksicht genommen werden. Die Länge der Primer sollte etwa 20 bp betragen. Die Schmelztemperatur beider Primer sollte wenn möglich gleich sein und bei etwa 60°C liegen. Der GC-Gehalt der Oligonukleotide sollte sich zwischen 40 und 60% befinden. Des Weiteren muss die Sequenz der Primer so gewählt werden, dass Haarnadelstrukturen, Primerdimere und poly(A)- bzw. lange G/C-Bereiche möglichst vermieden werden [51]. Um diesen komplexen Anforderungen gerecht zu werden kann man sich diverser Computerprogramme bedienen. So wurde zur Auswahl der hier beschriebenen Primer die Primer3-Software des *Whitehead Instituts*¹ verwendet.

¹ <http://frodo.wi.mit.edu/>

Primer	Basenzahl	GC%	Tm	Sequenz 5'-3'
1F	18	61,1	58,0	TCCCGGGTGATGACGTAG
1R	18	66,7	61,0	CGTACCGGACCCACTGAG
2F	25	32,0	59,0	AATTGTTCTGTTATCATCAACCTTC
2R	20	60,0	63,0	CGCCTGGAACACACTAGCTC
3F	24	41,7	62,0	GTAGCATCAAAGAGCATCAAGTAG
3R	22	36,4	57,0	AGATTTCACTTTCCATTCCAA
4F	20	45,0	56,0	AGCCCGAATAGCTTGTTTTG
4R	20	45,0	56,0	TGAAATGTGCCACAACCTTGG
5F	20	50,0	58,0	ACTCCAGCTTGGGCAATAAG
5R	24	41,7	62,0	GCGTACGTTAGACACATTTAAGTC
6F	20	40,0	54,0	CAATGATGTTGGCCTTTTGT
6R	21	42,9	57,0	TCCCCTGTAACCAAGTTCAAA
7F	22	40,9	58,0	CCTGAAATATGATTTCCCTGACA
7R	20	50,0	58,0	CTCCCAAAGCTGAATGACC
8F	20	50,0	58,0	TGGAACCCATGGATATGGAG
8R	20	40,0	54,0	GCAATTTGCCCAGGATAAAA
9F	21	42,9	57,0	GTCAATTTTAAACCTCGGAGC
9R	24	29,2	57,0	TCATAAATTTCAATGTGCTAATGC
10F	21	42,9	57,0	AACACTTGAGAAATTGCTGGC
10R	20	45,0	56,0	TTCTTCCCCAAAGCCAATAC
11F	20	40,0	54,0	TTGAAGAGCTGCATTTGATG
11R	21	42,9	57,0	AAATGCTGTTTCTCAACCACC
12F	20	45,0	56,0	CTTTGCGAACAATTCCCTTC
12R	20	40,0	54,0	TTTTGCTGGAAATGAGCAAC
13F	20	50,0	58,0	CCCCTCAACAATTGCTATCC
13R	22	50,0	62,0	CTGATAAGGTCTGCAAGGGAAG
14F	20	45,0	56,0	TGTCATGCACATCCGGTAAT
14R	23	47,8	63,0	GGAGCTGTGAGAATATCCTGTTC
*13+14F	20	50,0	52,0	CCCCTCAACAATTGCTATCC
*13+14R	23	48,0	55,0	GGAGCTGTGAGAATATCCTGTTC

Tabelle 2.1: Auflistung der verwendeten Primer. Die Nummerierung entspricht dem jeweils amplifizierten DLD-Exon. F = forward Primer, R = reverse Primer, GC% = GC-Gehalt des Primers in %, Tm = Schmelztemperatur des Primers. *: für einige Patientenproben wurden Exon 13 und 14 zusammen in einem PCR-Produkt amplifiziert.

2.2 Agarose - Gelelektrophorese

Nach erfolgter PCR wurde mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese kontrolliert, ob die Reaktion erfolgreich war, die PCR-Produkte in der erwarteten Größe amplifiziert wurden und ob sich keine unspezifischen PCR-Produkte gebildet hatten. Dazu wurden DNA-Proben in ein Gel eingebracht. Eine an das Gel angelegte Spannung bewirkte eine Wanderung der DNA-Fragmente durch das Gel in Richtung Anode. Ermöglicht wurde dies durch die negative Ladung ihrer Phosphatgruppen [51]. Da die Passagegeschwindigkeit von DNA-Fragmenten durch die Poren des Agarosegels umgekehrt proportional zu ihrem Molekulargewicht ist, konnten sie somit voneinander getrennt werden [54]. Die Poren des Gels entstanden durch das Gelieren der Agarosemoleküle. Die Porengröße hing dabei von der Agarosekonzentration ab [55]. Um eine optimale Auftrennung der DNA-Fragmente zu erreichen, musste die Konzentration des Gels – und damit die Porengröße – an die Größe der DNA-Fragmente angepasst werden. Da DNA-Moleküle mit einer Größe zwischen 227 und 505 bp untersucht werden sollten, wurde ein 1%iges Gel verwendet. Diese Gelkonzentration ist zur Untersuchung solcher Fragmentgrößen gut geeignet [56]. Um die aufgetrennten DNA-Moleküle für die spätere Analyse sichtbar zu machen, wurde dem Gel Ethidiumbromid beigefügt. Dieser Farbstoff interkaliert mit der DNA und kann durch Bestrahlung mit ultraviolettem Licht zur Fluoreszenz angeregt werden [57].

Zur Herstellung der Gele wurde Agarose in 1x Tris-Acetat- (TAE-) Puffer erhitzt (1g Agarose auf 100ml TAE-Puffer). Nach dem Erhitzen wurde dem noch flüssigen Gel zunächst Ethidiumbromid beigefügt (TAE-Puffer/Ethidiumbromid = $10^5/5$), bevor es zum Erkalten in die Gelschlitten gegossen wurde. Ein in den Schlitten eingebrachter Rechen formte die Geltaschen, in die später die PCR-Produkte aufgenommen werden sollten.

Nach dem Erkalten des Gels wurde es in eine mit 1x TAE-Puffer gefüllte Elektrophoresekammer (*MINI-SUB*-Elektrophoresekammer von *Biorad*) aufgenommen und mit den zu überprüfenden PCR-Produkten beladen. Den Proben wurde dabei zunächst Ladepuffer (6x) von *Fermentas* zugesetzt (Ladepuffer/PCR-Produkt = $\frac{1}{4}$; Gesamtmenge = 10 μ l). Dadurch wurde

einerseits die Dichte der Proben erhöht, wodurch sie besser in die Geltaschen absanken, andererseits halfen die enthaltenen Farbstoffe dabei das Laufverhalten der Proben im Gel zu beurteilen. Der verwendete Ladepuffer enthielt zwei Farbstoffe mit definierten Wanderungsgeschwindigkeiten im Gel – Bromophenolblau und Xylen Cyanol FF. In 1%igen Agarosegelen wandert Bromophenolblau mit der Geschwindigkeit eines 300 bp langen DNA-Fragmentes, wohingegen Xylen Cyanol FF zur Beurteilung von 4000 bp langen Fragmenten geeignet ist. Zur Auftrennung wurde eine Spannung von 100 V angelegt. Zur Größenbestimmung der DNA-Fragmente diente ein 100 bp Längenstandard von *AppliChem*, der parallel mitlief.

Agarose-Gelelektrophorese

Ladepuffer (<i>Fermentas</i>)		TAE-Puffer (<i>Sigma</i>)	
6x Loading Dye	0.03% Bromophenol Blau	50x TAE (ph 8,0 mit NaOH)	2 M Tris-Acetat
	0.03% Xylen Cyanol FF		0,05 M EDTA
	60% Glycerol		
	60 mM EDTA		
	10 mM Tris-HCl (pH 7.6)		
Längenstandard (<i>AppliChem</i>)			
DNA Ladder 100 bp			
Fragmentgrößen (bp): 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 150, 100			

Nach der Elektrophorese wurden die aufgetrennten DNA-Banden mit dem *GelJet Imager* von *INTAS* durch UV-Licht sichtbar gemacht und fotografisch dokumentiert (siehe auch Abbildung 3.1).

2.3 Heteroduplexanalyse mittels Denaturing High-Performance Liquid Chromatography

Nachdem die PCR-Produkte mittels Agarose-Gelelektrophorese überprüft wurden, schloss sich die Mutationsanalyse an. Wie bereits in Abschnitt 1.5 beschrieben, wurde hierzu eine Denaturing High-Performance Liquid Chromatographie durchgeführt.

2.3.1 Vorbereitung der Proben

Zur Herstellung etwaiger Heteroduplexe wurden die PCR-Produkte im *Biometra PCR Thermocycler T1* für 3 min bei 95°C denaturiert und danach für 30 min auf 37°C abgekühlt um die Einzelstränge zu renaturieren.

2.3.2 Einstellung der Schmelzprofile

Die Berechnung der Schmelzprofile wurde mit einem in die *Transgenomic Navigator™* Software integrierten Algorithmus durchgeführt. Da in DNA-Fragmenten Regionen mit hoher Schmelztemperatur neben Regionen mit niedriger Schmelztemperatur existieren, war es häufig notwendig die Chromatographie eines DNA-Abschnitts mit mehreren unterschiedlichen Untersuchungstemperaturen durchzuführen. Die korrekte Einstellung der Temperaturbereiche wurde über die graphische Benutzeroberfläche der *Transgenomic Navigator™* Software durchgeführt (siehe Abbildung 2.2).



Abbildung 2.2: Benutzeroberfläche der *Transgenomic Navigator™* Software am Beispiel von DLD-Exon 2. 1: Eingabemaske für die Basensequenz des untersuchten DNA-Fragments; 2: Eingabemaske für die gewünschte Untersuchungstemperatur; 3: Zeigt die helikale Fraktion des DNA-Fragments an der jeweiligen Basenposition bei der gewählten Temperatur; 4: Zeigt die helikale Fraktion des Doppelstrangs in Abhängigkeit von der Temperatur; 5: Zeigt die Verteilung der Schmelztemperatur über den DNA-Doppelstrang; 6: siehe 5.

Zunächst wurde die Basensequenz des zu untersuchenden DNA-Fragmentes eingegeben (1). Daraufhin errechnete die Software einen geeigneten Temperaturbereich. Der vorgeschlagene Temperaturbereich wurde dann so modifiziert, dass das DNA-Fragment mit möglichst wenigen Messungen komplett abgedeckt werden konnte. Dabei wurde die Temperatur so eingestellt, dass die Homoduplexe zu mindestens 75% in helikaler Form vorlagen. So konnte gewährleistet werden, dass sich die Elutionszeiten von Homo- und Heteroduplexen ausreichend unterschieden. Der Anteil des untersuchten DNA-Fragmentes, der bei der gewählten Temperatur (2) noch in helikaler Form vorliegt, wurde mit Hilfe eines Graphen dargestellt (3).

Ein weiterer Parameter, der für jedes Amplikon neu eingestellt werden musste, war der Konzentrationsgradient von Puffer B. Da die Adsorption der Amplikons an die Säule in relativ zur Größe der Amplikons zunahm, musste man um ähnliche Elutionszeiten zu erreichen auch die Startkonzentration des Puffers B für jedes DNA-Fragment neu einstellen. Diese Einstellung erfolgte mit Hilfe der Software automatisch (siehe Tabelle 2.2).

Exon	Amplikon (Basenpaare)	Temperatur (°C)	Gradientendauer (min)	Startkonzentration Puffer B (%)
1	227	63,3 / 66,0	4,5	52,1
2	328	53,6 / 54,6 / 58,6	4,5	55,5
3	445	53,6 / 54,4 / 56,1	4,5	57,8
4	299	53,9 / 55,2 / 57,0	4,5	54,7
5	292	54,6 / 55,3	4,5	54,5
6	363	53,6 / 56,8	4,5	56,3
7	460	54,2 / 56,0 / 57,5	4,5	58,0
8	496	53,7 / 54,7 / 55,4	4,5	58,5
9	505	54,7 / 55,4 / 56,8	4,5	58,6
10	369	54,1 / 56,9	4,5	56,4
11	394	55,8 / 58,7	4,5	56,9
12	363	56,9 / 58,7	4,5	56,3
13	270	57,3	4,5	53,8
14	262	54,9 / 55,9	4,5	53,5
13+14	413	54,1 / 55,2 / 56,2	4,5	57,3

Tabelle 2.2: HPLC-Einstellungen. Gezeigt sind die verwendeten Temperaturbereiche, die Dauer des Acetonitrilgradienten sowie die Konzentration von Puffer B zu Beginn des Gradienten (siehe auch Abschnitt 1.5).

2.3.3 Analyse der PCR-Produkte

Bevor die Proben mit dem *WAVE System Model 3500A* untersucht werden konnten, wurde die Chromatographiesäule *DNASep™* 15 min lang mit einer Mischung aus *WAVE Optimized™ Buffer A* (0,1M TEAA) und *WAVE Optimized™ Buffer B* (25% Acetonitril, 75% H₂O) in jeweils 50%iger Konzentration äquilibriert. Nachdem die errechneten Temperaturen und Schmelzprofile für die Proben eingestellt worden waren, lief die Injektion und Analyse der Proben vollautomatisch ab. Die eluierten Proben wurden nach dem Durchlaufen der Säule von einem UV-Absorptions-Detektor bei 260 nm (= Nanometer) registriert. Die gemessenen Absorptionen wurden mit Hilfe der *Transgenomic Navigator™* Software in eine Graphik umgewandelt. Nach Abschluss der Messungen wurden die Chromatogramme nach Auffälligkeiten durchsucht. Dabei wurden Chromatogramme, die zwei oder mehr annähernd gleich große Peaks aufwiesen oder sich in einer bestimmten Form von den anderen Proben derselben Messreihe unterschieden, als auffällig gewertet und sequenziert. Im Anschluss an jeden Messzyklus wurde die Säule mit *WAVE Optimized™ Solution D* (25% H₂O, 75% Acetonitril) gereinigt. Darüber hinaus wurde zur Überprüfung der Detektionsverlässlichkeit der DHPLC in regelmäßigen Abständen eine Testmessung mit dem *WAVE® Low Range Mutation Standard* durchgeführt. Dieser Kontrollstandard enthielt künstlich generierte Homo- und Heteroduplexe. Wenn das Chromatogramm dieser Testmessung bei einer Temperatur von 56°C vier scharf voneinander abgrenzbare Peaks anzeigte, konnte man von einer einwandfreien Detektionsverlässlichkeit der DHPLC ausgehen^{m, n}.

2.4 Sequenzierung

Die Sequenzierung auffälliger Patientenproben erfolgte durch *Cycle-sequencing*. Dabei handelt es sich um eine Weiterentwicklung des Kettenabbruchverfahrens nach Sanger. Mithilfe einer Polymerase, einer DNA-Matrize (aufgereinigte PCR-Produkte; siehe unten) und sequenzspezifischer

^m <http://www.transgenomic.com/pd/biocon/standards.asp?tab=3>

ⁿ <http://www.transgenomic.com/lib/msds/560077.pdf>

Primer werden dabei DNA-Stränge synthetisiert. Das Reaktionsgemisch enthält jedoch neben Desoxynukleosidtriphosphaten (dNTP) auch Didesoxynukleosidtriphosphate (ddNTP). Die ddNTPs sind zusätzlich am 3'-C-Atom desoxygeniert, wodurch es nach ihrem Einbau zum Kettenabbruch kommt. Da die dNTPs jedoch im Überschuss vorliegen, kommt es während der Sequenzierungsreaktion relativ selten zum Kettenabbruch, sodass statistisch Sequenzierungsfragmente in jeder möglichen Länge entstehen. Um später erkennen zu können, bei welcher Base der Kettenabbruch erfolgte, ist jeder der vier ddNTPs mit einem anderen Fluoreszenzfarbstoff markiert. Im Gegensatz zum ursprünglichen Kettenabbruchverfahren nach Sanger können beim *Cycle-sequencing* durch die Verwendung einer thermostabilen Polymerase mehrere Sequenzierungsreaktionen hintereinander ablaufen, wodurch es zu einer Signalverstärkung kommt. Als Matrizen für die Sequenzierungsreaktion dienen PCR-Produkte.

2.4.1 Vorbereitung der PCR-Produkte

Vor der Sequenzierung wurden die PCR-Produkte zunächst einem enzymatischen Verdau unterzogen. Dadurch wurden überschüssige Primer und dNTPs entfernt. Dieser Schritt war notwendig, da für die folgenden Sequenzierungen *forward*- und *reverse*-Primer in separaten Reaktionsansätzen verwendet wurden. Da in PCR-Produkten jedoch ein unverbrauchter Rest beider Primer enthalten ist, mussten diese zunächst entfernt werden. Darüber hinaus ist es für die Sequenzierreaktion wichtig, dass dNTPs und ddNTPs in einem genau abgestimmten Mengenverhältnis vorliegen. Daher wurden auch überschüssige dNTPs enzymatisch verdaut. Verwendet wurden dazu zwei bakterielle Enzyme, die *Exonuclease I* und die *Antarctic Phosphatase*. Die *Exonuclease I* stammt aus dem E.coli Stamm NM554 und gehört zur Gruppe der Phosphodiesterasen. Das Enzym katalysiert die schrittweise Abspaltung von Desoxyribonukleotid-5'-Monophosphaten vom 3'-Ende eines einzelsträngigen DNA-Stranges. Somit konnte einzelsträngige DNA in Form von Primer-Oligonukleotiden, selektiv aus dem PCR-Produkt entfernt werden^o [58].

^o <http://www.neb.com/nebecomm/products/productM0293.asp>

Die *Antarctic Phosphatase* gehört zu den alkalischen Phosphatasen und wurde ursprünglich aus dem antarktischen Bakterium TAB5 isoliert. Dieses Enzym katalysiert die Abspaltung von endständigen 5'-Phosphatgruppen von DNA- und RNA-Fragmenten, was die Entfernung von überschüssigen dNTPs und Pyrophosphaten aus den PCR-Produkten ermöglichte^p [59].

Für den Verdau wurden je 5 µl des jeweiligen PCR-Produkts zusammen mit 1 U *Exonuclease I* und 1 U *Antarctic Phosphatase* für 15min bei 37°C im *Biometra PCR Thermocycler T1* inkubiert. Abschließend wurden die Enzyme für 20min bei 80°C inaktiviert

Exo-AP-Verdauungsansatz (6µl)

1 U Exonuclease I (New England BioLabs)
1 U Antarctic Phosphatase (New England BioLabs)
5 µl PCR-Produkt

2.4.2 Sequenzierungsreaktion

Nach der Aufbereitung der PCR-Produkte wurde die Sequenzierungsreaktion mit Hilfe des *BigDye[®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* von Applied Biosystems (ABI) durchgeführt. Die benötigten ddNTPs und dNTPs waren bereits in geeignetem Verhältnis im *BigDye[®] Terminator Mix 3.1* enthalten. Um das Reaktionsgemisch für die Sequenzierung herzustellen wurden das enzymatisch gereinigte PCR-Produkt, die dazugehörigen Primer, der im Kit enthaltene *BigDye[®] Terminator Mix 3.1* und der Sequenzierungspuffer zusammen pipettiert. Im Gegensatz zur PCR wurden jedem Reaktionsansatz jedoch nur *forward*- oder *reverse*-Primer zugesetzt. Dadurch kam es nicht zu einer weiteren Amplifikation der PCR-Produkte, sondern nur zu einer Sequenzierungsreaktion in Richtung entweder des *forward*- oder des *reverse*-Stranges. Für diese Reaktion wurden die gleichen Primer benutzt, wie auch zur Amplifikation des jeweiligen PCR-Produktes. Die Sequenzierungsreaktion erfolgte im *Biometra PCR Thermocycler T1*.

^p http://www.neb.com/nebecomm/products_intl/productm0289.asp

Reaktionsgemisch (10 µl)	Sequenzierungsreaktion	
0,5µl BigDye Terminator Mix 3.1 (ABI)	1. Initial	96°C 30s
1x Sequenzierungspuffer (ABI)	2. Denaturierung	96°C 10s
0,2 µM Primer (forward oder reverse)	3. Annealing	50°C 5s
1µl aufgereinigtes PCR-Produkt	4. Elongation	60°C 4min
	27 Zyklen Schritt 2 bis 4	

2.4.3 Fällung der Sequenzierungsprodukte

Um die Sequenzierungsprodukte anschließend von Salzen und überschüssigen ddNTPs zu befreien wurden sie mit einer Lösung aus 2,0µl NaOAc (Natriumacetat 3M, pH 5,2) und 50µl 100%igem EtOH (Ethanol) gefällt und bei 4°C mit 20800 g für 30 min zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Pellet mit –20°C kaltem 70%igem EtOH gewaschen und erneut bei 4°C mit 20800 g für 10 min zentrifugiert. Nach einmaliger Wiederholung des Wasch- und Zentrifugationsschrittes wurde der Überstand erneut verworfen und das Pellet in der Vakuumzentrifuge (*SpeedVac Plus SC110A*) für 10 bis 15 min getrocknet. Abschließend wurde das Pellet in 15µl *Hidi Formamid* (*Applied Biosystems*) aufgenommen.

2.4.4 Sequenzanalyse

Die Sequenzanalyse wurde im Kapillarsequenzierer *Genetic Analyzer 3130* (*AppliedBiosystems*) durchgeführt. Dort erfolgte die elektrophoretische Auftrennung der Sequenzierprodukte in Kapillaren, die mit dem Polymer POP7 (*AppliedBiosystems*) gefüllt waren. Analog zur Agarose-Gelelektrophorese ist hier die Wanderungsgeschwindigkeit der DNA-Fragmente umgekehrt proportional zu ihrer Größe. Im Sinne des vorher beschriebenen Kettenabbruchverfahrens entstehen bei der Sequenzierungsreaktion DNA-Fragmente in jeder möglichen Länge. Daher gibt die Reihenfolge, in der die Fragmente einen Detektor passieren, die Basensequenz der untersuchten Probe an. Als Detektor diente ein CCD-Chip (*charge-coupled device*), der das spezifische Emissionsspektrum der durch Laserlicht angeregten Fluoreszenzfarbstoffe registrierte. Mit Hilfe der *Sequencing Analysis Software 5.2* (*AppliedBiosystems*) konnten die gewonnenen Daten ausgewertet werden.

2.5 Einordnung positiver Funde

Die mittels Sequenzierung identifizierten Mutationen wurden im Anschluss mit bereits bekannten Erbgutveränderungen in diesem Bereich verglichen. Zunächst wurde die Sequenz der verdächtigen PCR-Produkte mit der Sequenz des betreffenden Exons abgeglichen, wie sie im *Ensembl Genome Browser*^q des *Sanger Instituts* verzeichnet war. In dieser Datenbank sind zusätzlich sämtliche bisher beschriebenen Sequenzvariationen gespeichert. Somit konnte schnell ermittelt werden, ob es sich bei einer Mutation um eine bereits beschriebene Sequenzvariante handelte. Die gelisteten Sequenzvarianten waren direkt mit der *NCBI SNP Database*^r verknüpft, einer Datenbank die detaillierte Informationen zu den bekannten SNPs zur Verfügung stellt und auch die aktuellen Erkenntnisse des HapMap Projektes enthält. Somit wurden bestimmte Eigenschaften der SNPs, die sich in den untersuchten PCR-Produkten des Patientenkollektives befanden, erkannt. Zur systematischen Erfassung der Mutationen wurde die von der *Human Genome Variation Society* vorgeschlagene Nomenklatur [60, 61] und die in der *NCBI SNP Database* hinterlegte Referenzsequenz verwendet. Informationen zu den Heterozygotieraten der erfassten Sequenzvarianten konnten der *Allele Frequency Database* entnommen werden^s [62, 63].

2.6 Einschlusskriterien für die Patienten

Die verwendeten DNA-Proben wurden uns freundlicherweise vom Kardiogenetischen Labor der Charité-Universitätsmedizin Berlin zur Verfügung gestellt. Sie stammten von Patienten mit der gesicherten Diagnose einer familiären dilatativen Kardiomyopathie (FDC). Zur Diagnosestellung wurden die Konsensus-Kriterien der Europäischen Arbeitsgruppe über familiäre dilatative Kardiomyopathien (*Collaborative Research Group of the European Human and Capital Mobility Project on Familial Dilated Cardiomyopathy*) verwendet [7].

^q http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Summary?g=ENSG00000091140

^r <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/index.html>

^s <http://alfred.med.yale.edu>

Demnach liegt eine FDC dann vor,

1. wenn es in einer einzelnen Familie zwei oder mehr Betroffene gibt oder
2. wenn ein Verwandter ersten Grades eines DCM-Patienten vor dem 35. Lebensjahr einen ungeklärten plötzlichen Herztod erlitten hat.

Falls bei Familienangehörigen nur geringe kardiale Auffälligkeiten bestehen, sollen folgende Kriterien die Einordnung erleichtern.

Hauptkriterien:

1. Es liegt eine Ejektionsfraktion von unter 45% und / oder eine reduzierte fraktionelle Faserverkürzung von unter 25% vor.
2. Der linksventrikuläre enddiastolische Durchmesser liegt 117% über dem für das Alter und die Körperoberfläche liegendem Normwert.

Nebenkriterien:

1. Ungeklärte supraventrikuläre oder ventrikuläre (Tachy-)Arrhythmien vor dem 50. Lebensjahr.
2. Linksventrikuläre Dilatation über 112% des Normwertes.
3. Linksventrikuläre Dysfunktion: Ejektionsfraktion unter 50% oder fraktionelle Faserverkürzung unter 28%.
4. Ungeklärte Reizleitungsstörung: AV-Block II. oder III. Grades, kompletter Linksschenkelblock, Sinusknotendysfunktion.
5. Ungeklärter plötzlicher Herztod oder Schlaganfall vor dem 50. Lebensjahr.
6. Segmentale Wandbewegungsstörungen in Abwesenheit einer intraventrikulären Reizleitungsstörung oder einer ischämischen Herzerkrankung.

Die familiäre DCM liegt vor, wenn ein Verwandter ersten Grades beide Hauptkriterien erfüllt, wenn eine linksventrikuläre Dilatation von über 117% des Normwertes und ein Nebenkriterium vorliegen, oder wenn drei Nebenkriterien zutreffend sind [7, 64].

2.7 Material

2.7.1 Verbrauchsmaterialien und Chemikalien

Agarose	Sigma
BigDye® Terminator Mix 3.1	Applied Biosystems
dNTP-Mix (10mM)	Fermentas
Ethanol	Sigma
Ethidiumbromid	Sigma
Falcon-Röhrchen (50ml, 15ml)	Greiner
H ₂ O	Milli Q
Hidi Formamid	Applied Biosystems
Ladepuffer für Agarosegelelektrophorese	Fermentas
Längenstandard 100 bp	AppliChem
Magnesiumchlorid	Solis Biodyne
Natriumacetat 3M, pH 5,2	Sigma
PCR-Primer	Metabion
PCR-Reaktionsgefäße 0,2ml	Hartenstein
Performance Optimizer Polymer (POP7)	Applied Biosystems
Pipettenspitzen	Sarstedt, Eppendorf
Puffer BD	Solis Biodyne
Reaktionsgefäße (1.5ml, 2ml)	Sarstedt, Eppendorf
Sequenzierungspuffer 1x	Applied Biosystems
TAE-Puffer (50x)	Sigma
WAVE Optimized™ Buffer A	Transgenomic
WAVE Optimized™ Buffer B	Transgenomic
WAVE Optimized™ Solution D	Transgenomic
WAVE® Low Range Mutation Standard	Transgenomic

2.7.2 Enzyme

Antarctic Phosphatase	New England BioLabs
DNA-Polymerase (HOT FIREPol®)	Solis Biodyne
Exonuclease I	New England BioLabs

2.7.3 Geräte und Software

Chromatographiesäule DNASep™	Transgenomic
Elektrophoresekammer (Mini-Sub)	Biorad
Geldokumentationsgerät (GelJet Imager)	Intas
Genetic Analyzer 3130	Applied Biosystems
Multipipette	Eppendorf
Navigator™ Software	Transgenomic
PCR Thermocycler T1	Biometra
PCR-Reaktionsgefäße	Hartenstein
Pipetten 20, 200, 1000 µl	Gilson Pipetman
Sequencing Analysis Software 5.2	Applied Biosystems
Tischzentrifuge Microspin FV 2400	Biosan
Vakuumentrifuge Speed Vac Plus SC110A	Savant
Vortex	Scientific Industries
Waage Laboratory LC 4800 P	Sartorius
WAVE System Model 3500A	Transgenomic
Zentrifuge 5415 D, 5417 R, 5804	Eppendorf

3 Ergebnisse

Nachdem durch die Arbeitsgruppe Zimmer am Institut für Klinische Biochemie und Pathobiochemie der Universität Würzburg eine neue Mutation im Gen der Dihydrolipoamid-Dehydrogenase entdeckt worden war, die vermutlich für eine familiäre DCM verantwortlich war, sollte nun untersucht werden, ob eine Korrelation zwischen dem Auftreten von genetischen Alterationen im DLD-Gen und der Entwicklung einer familiären DCM besteht. Des Weiteren wurde überprüft, ob sich die Rate bestimmter Polymorphismen im DLD-Gen bei Patienten mit einer FDC von der Häufigkeitsverteilung in der Normalbevölkerung unterscheidet. Zu diesem Zweck wurden die 14 Exons der Dihydrolipoamid-Dehydrogenase eines Kollektivs von 88 FDC-Patienten auf heterozygote Mutationen hin untersucht. Hierfür wurden die DNA-Abschnitte, die die jeweiligen Exons enthielten, mittels PCR amplifiziert.

Die folgende Abbildung zeigt eine Agarose-Gelelektrophorese aller verwendeten Exonabschnitte des DLD-Gens. Wie zu erkennen ist, amplifizierte die PCR die gewünschten DNA-Fragmente in der erwarteten Größe. Unspezifische PCR-Produkte oder andere Verunreinigungen wie Primer-Dimere sind nicht zu sehen.

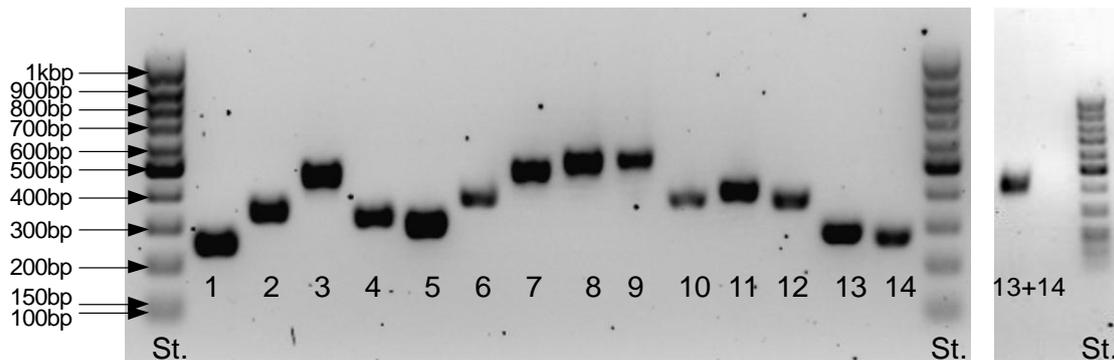


Abbildung 3.1: Agarose-Gelelektrophorese aller DLD-Exonabschnitte (1-14). St.= Längenstandard; Fragmentgrößen: 1 = 227 bp, 2 = 328 bp, 3 = 445 bp, 4 = 299 bp; 5 = 292 bp; 6 = 363 bp , 7 = 460 bp , 8 = 496 bp; 9 = 505 bp; 10 = 369 bp; 11 = 394 bp; 12 = 363 bp; 13 = 270 bp , 14 = 262 bp; 13+14 = 413 bp.

Im Anschluss an die Gelelektrophorese wurden die PCR-Produkte mittels Denaturing High-Performance Liquid Chromatography auf das Vorhandensein heterozygoter Mutationen untersucht und bei Auffälligkeiten sequenziert. Als auffällig gewertet wurden dabei alle Chromatogramme mit ausgeprägten Doppelpeaks oder anderen Merkmalen, durch die sie sich von Proben der gleichen Messreihe unterschieden (siehe auch 1.5 Einführung in die Denaturing High-Performance Liquid Chromatography und 4.2 Bedeutung zusätzlicher Peaks in Abwesenheit einer Mutation). Im Folgenden schließt sich die topologisch geordnete Beschreibung der detektierten Mutationen an.

3.1 PCR-Produkt 6

Dieses PCR-Produkt wurde bei 53,6°C und 56,8°C in der DHPLC untersucht. Bei Patient 3021 bot sich in beiden Temperaturbereichen ein auffälliges Elutionsprofil (siehe Abbildung 3.2), wohingegen alle anderen Proben unauffällige Chromatogramme zeigten (siehe Abbildung 3.3).

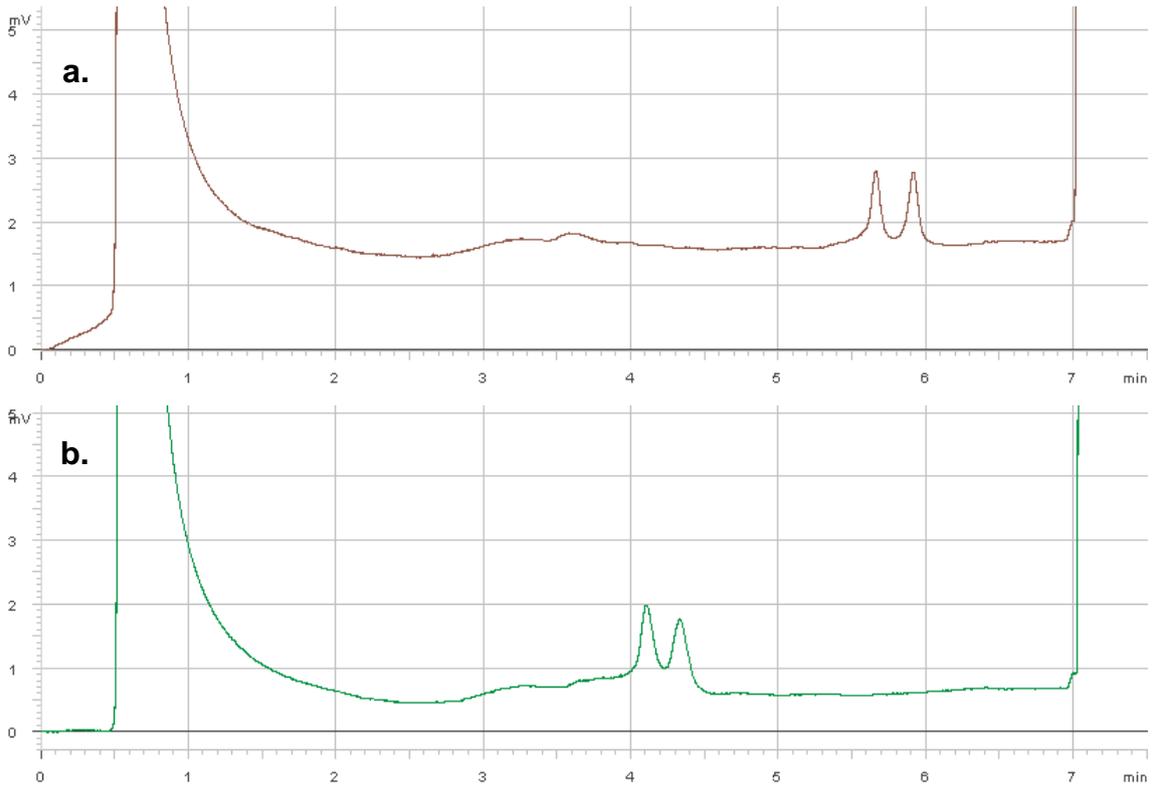


Abbildung 3.2: Chromatogramme von PCR-Produkt 6 des Patienten 3021. a. 53,6°C b. 56,8°C. In beiden Chromatogrammen zeigt sich ein auffälliger Doppelpeak.

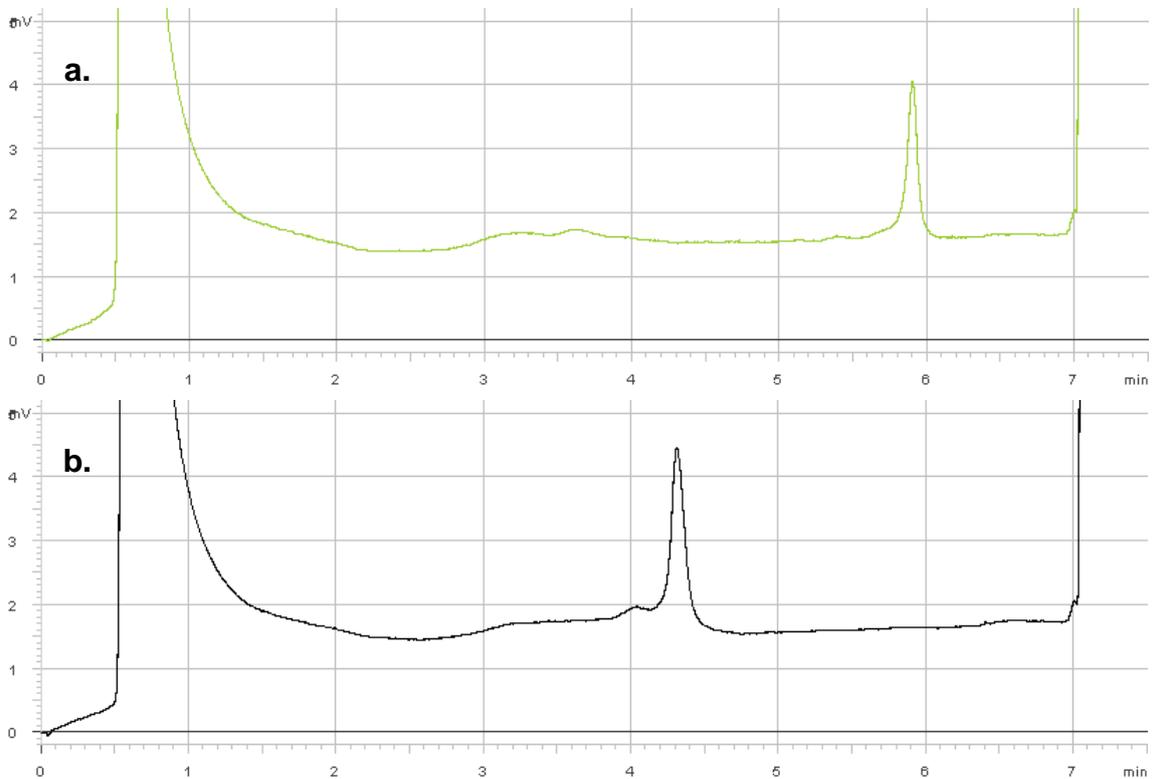


Abbildung 3.3: Vergleichschromatogramme von PCR-Produkt 6 (Patient 3069). a. 53,6°C b. 56,8°C. In beiden Chromatogrammen zeigt sich nur ein einzelner Peak.

Mittels Sequenzierung konnte eine Mutation im Bereich von Intron 5 detektiert werden (siehe Abbildung 3.4). Es handelte sich um eine Substitution zwischen Thymin und Adenin (*NM_000108.3:c.338-81T>A*). Die Mutation ist bisher nicht in der *NCBI SNP Database* annotiert.

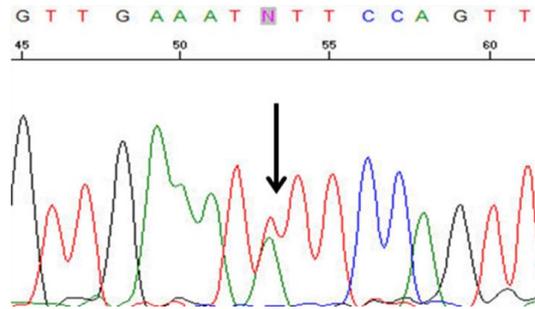


Abbildung 3.4: Thymidin/Adenin-Substitution (*NM_000108.3:c.338-81T>A*) bei Patient 3021.

3.2 PCR-Produkt 7

Das Exon 7 enthaltende PCR-Produkt wurde bei 54,2°C, 56,0°C und 57,5°C untersucht. Die resultierenden Chromatogramme zeigten bei den Patienten 3448, 4367, 4479, 4512 und 4573 auffällige Profile (siehe Abbildung 3.5), wohingegen alle anderen Patientenproben unauffällige Chromatogramme aufwiesen (siehe Abbildung 3.6.).

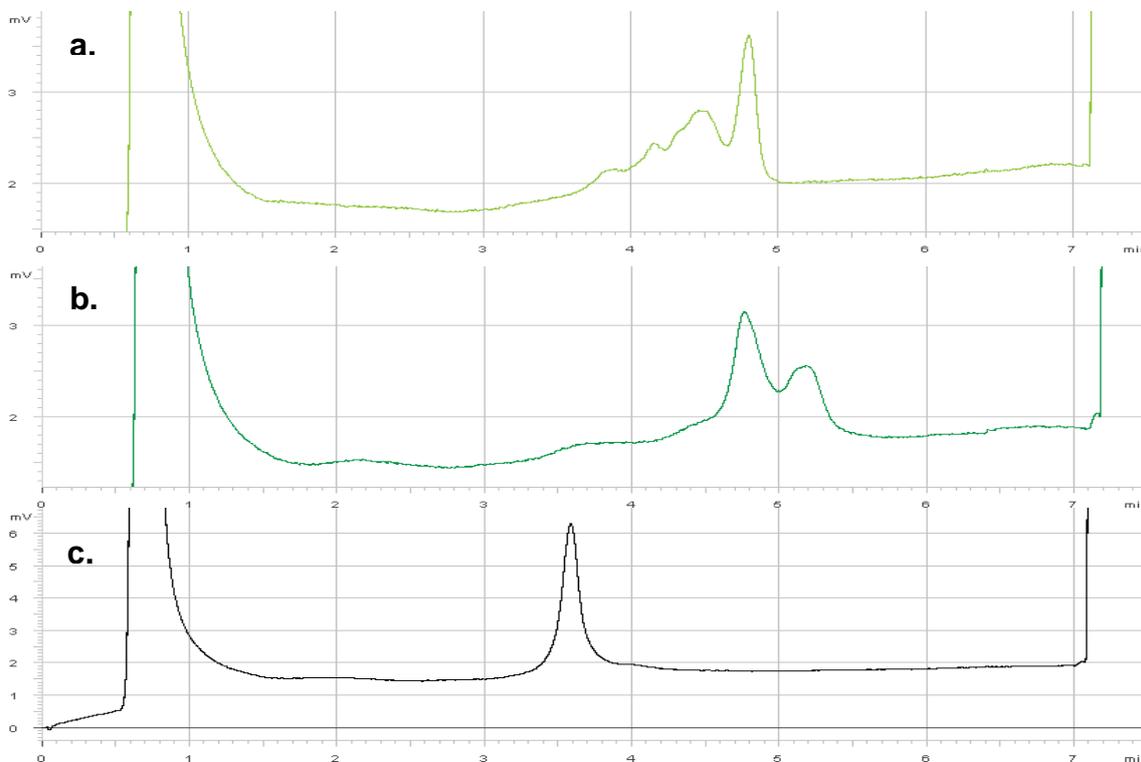


Abbildung 3.5: Chromatogramme von PCR-Produkt 7 des Patienten 4573 (repräsentativ für Patient 3448, 4367, 4479, 4512). a. 54,2°C b. 56,0°C c. 57,5°C. Bei 54,2°C und 56,0°C zeigen sich auffällige Doppelpeaks.

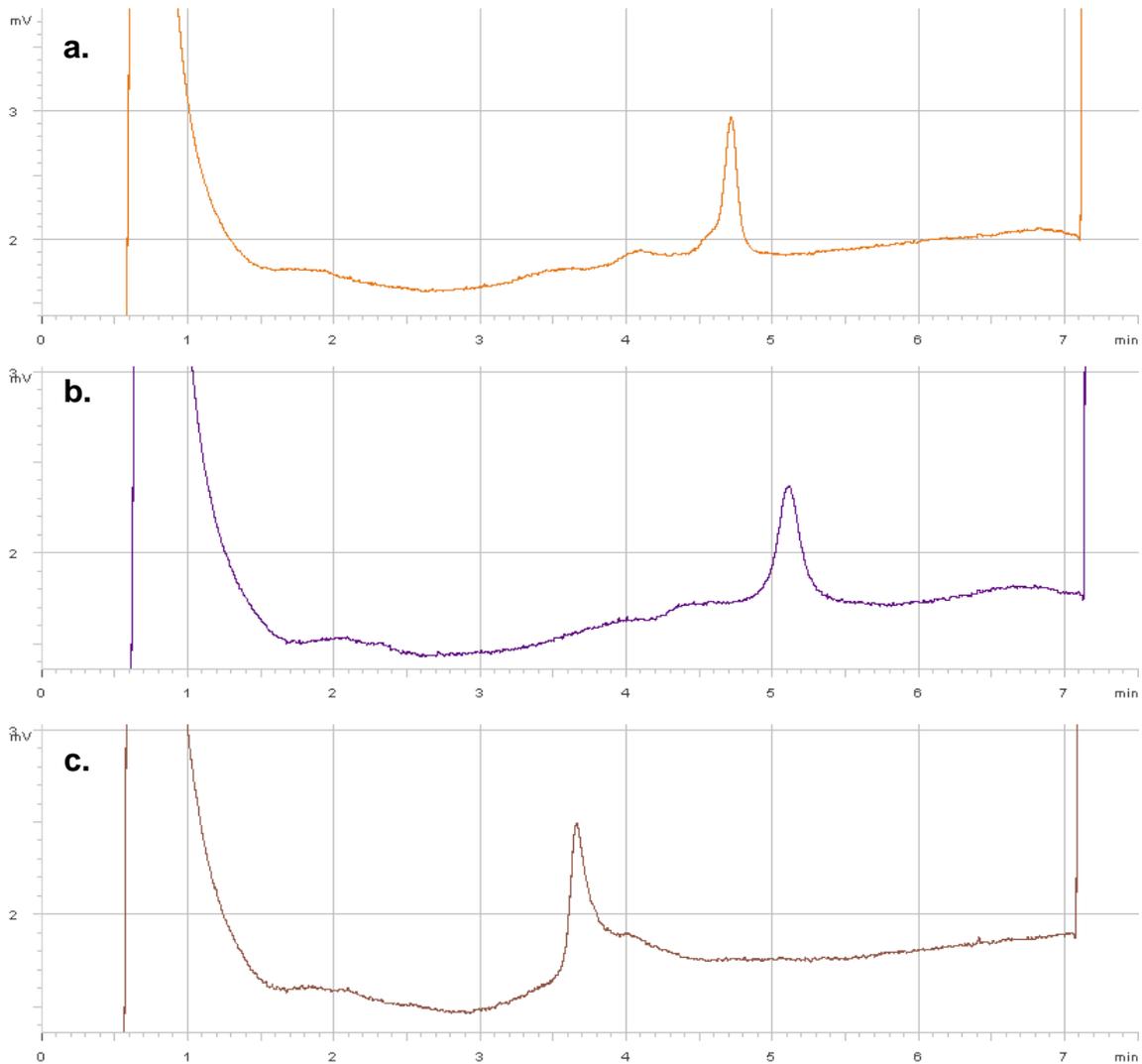


Abbildung 3.6: Vergleichschromatogramme von PCR-Produkt 7 (Patient 4528) a. 54,2°C b.56,0°C c. 57,5°C. In allen Chromatogrammen zeigt sich nur ein einziger Peak.

Durch die darauf folgende Sequenzierung, konnte bei den vier Patienten eine Substitution zwischen Thymin und Cytosin (*NM_000108.3:c.439-7T>C*) im Intron 6 festgestellt werden (siehe Abbildung 3.7). Dabei handelte es sich um einen bekannten Einzelnukleotid-Polymorphismus (SNP) mit der Referenzsequenznummer *rs10263341*.

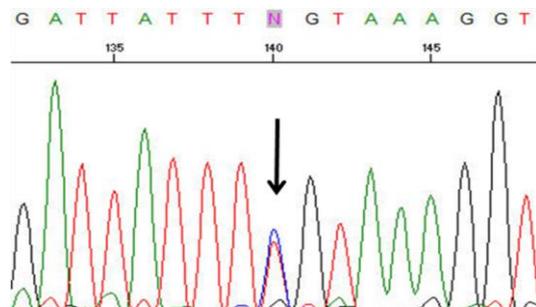


Abbildung 3.7: Thymin/Cytosin-Substitution (*NM_000108.3:c.439-7T>C*) bei Patient 4573 (repräsentativ für Patient 3448, 4367, 4479, 4512).

Die durchschnittliche Heterozygotierate für diesen Polymorphismus beträgt 0,332^t [62, 63]. Der SNP liegt zwar in einer 3' Spleißstelle (7 bp von Exon 7 entfernt)^u, in Phase II und III des HapMap Projekts konnte bisher jedoch keine klinische Assoziation gezeigt werden.

3.3 PCR-Produkt 8

Bei der Untersuchung dieses PCR-Produktes in den Temperaturbereichen 53,7°C, 54,7°C und 55,4°C konnten bei den Patienten 4527, 4529 und 4532 auffällige Chromatogramme erkannt werden (siehe Abbildung 3.8). Die Chromatogramme der übrigen Patienten unterschieden sich davon deutlich (siehe Abbildung 3.9).

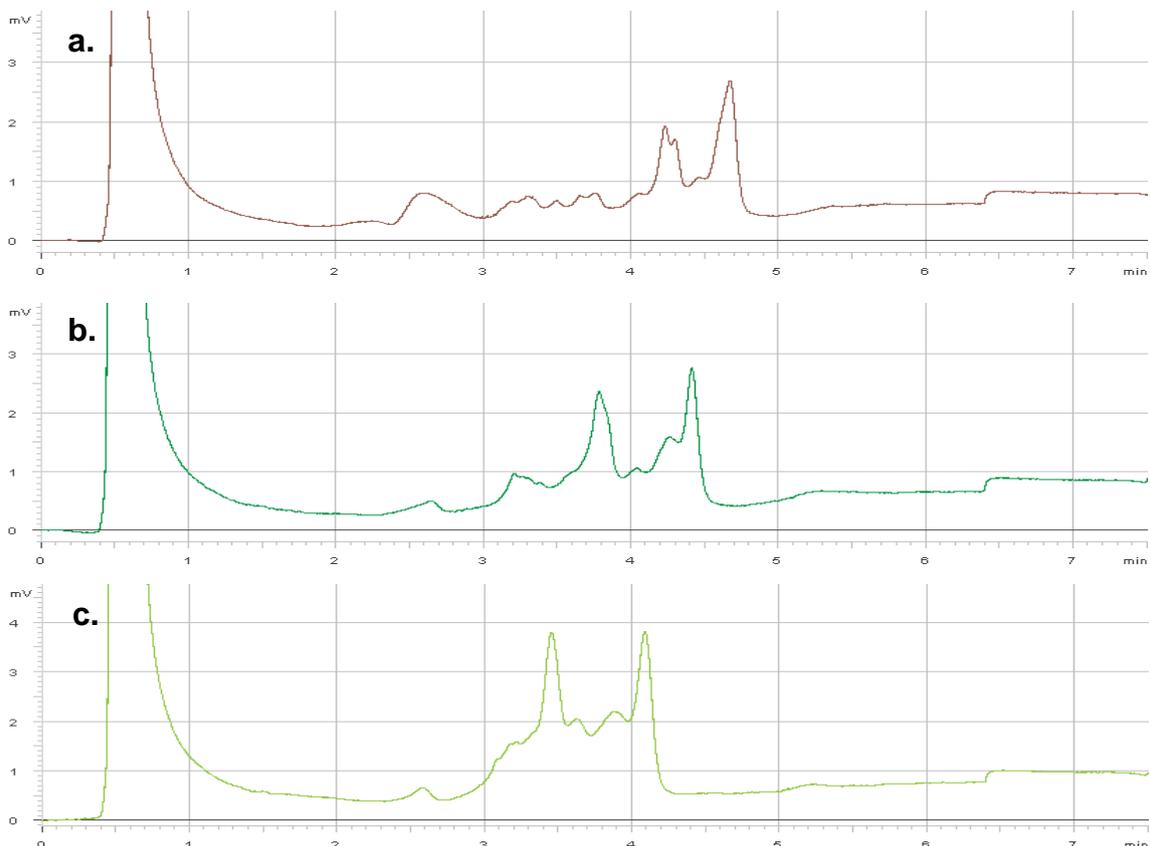


Abbildung 3.8: Chromatogramme von PCR-Produkt 8 des Patienten 4527 (repräsentativ für Patient 4529 und 4532) **a.** 53,7°C **b.** 54,7°C **c.** 55,4°C. In allen untersuchten Temperaturbereichen zeigen sich ausgeprägte Doppelpeaks.

^t http://alfred.med.yale.edu/alfred/recordinfo.asp?condition=sites.site_uid=%27SI036630S

^u http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Transcript/Exons?db=core;g=ENSG00000091140;r=7:107531415-107572175;t=ENST00000205402

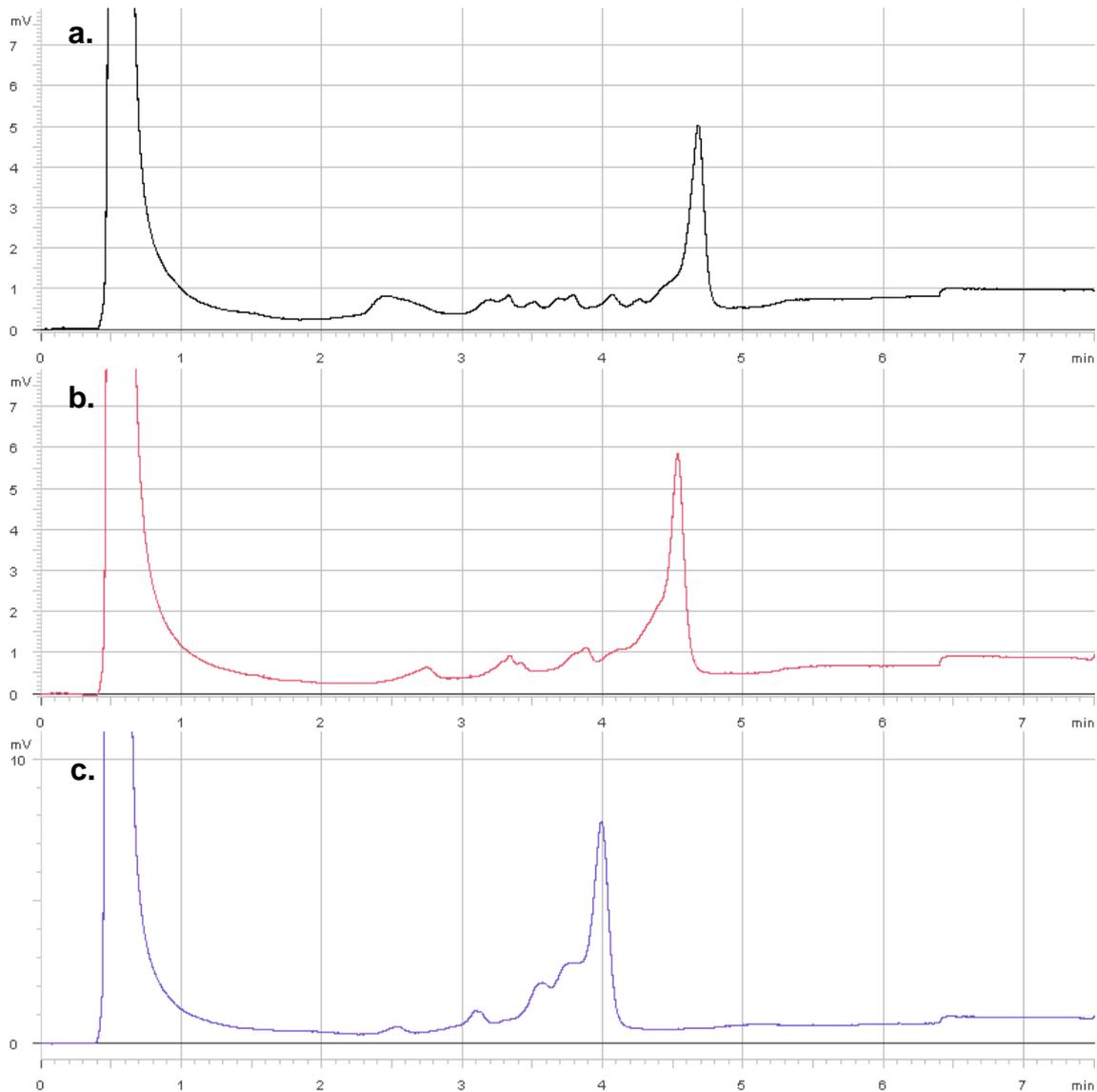


Abbildung 3.9: Vergleichschromatogramme von PCR-Produkt 8 (Patient 4515). a. 53,7°C b. 54,7°C c. 55,4°C. In allen Chromatogrammen zeigt sich nur ein prominenter Peak.

Infolgedessen wurden bei jeder dieser Proben zwei bekannte SNPs in Intron 8 nachgewiesen. Dabei handelte es sich um einen Basenaustausch zwischen Adenin und Guanin (*NM_000108.3:c.684+124A>G*) mit der Referenznummer *rs10281520* und zwischen Guanin und Cytosin (*NM_000108.3:c.684+189G>C*), welcher unter der Nummer *rs10252490* annotiert ist.

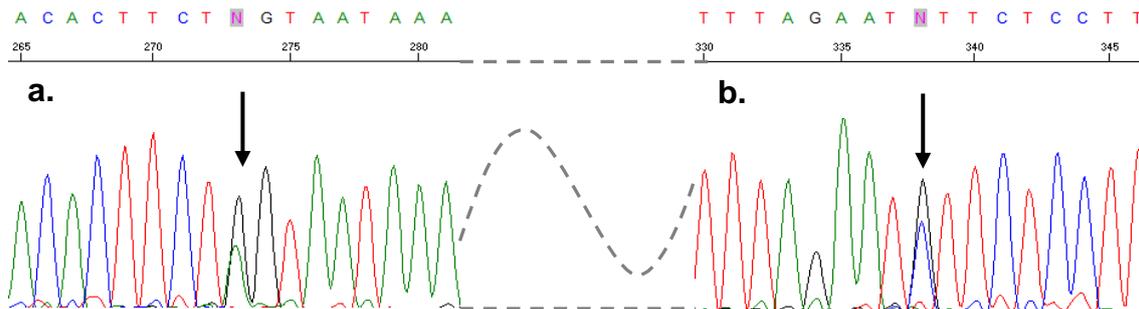


Abbildung 3.10: Mutationen in PCR-Produkt 8 bei Patient 4527 (repräsentativ für Patient 4529 und 4532). **a.** Adenin/Guanin (*NM_000108.3:c.684+124A>G*) **b.** Guanin/Cytosin (*NM_000108.3:c.684+189G>C*).

Beide Mutationen traten bei den genannten Patienten stets zusammen auf. Für den Polymorphismus *rs10281520* wird eine Heterozygotierate von 0.401^v [62, 63] angegeben. Für *rs10252490* gibt es diesbezüglich noch keine schlüssigen Daten.

Der Polymorphismus *rs10281520* wurde im Rahmen von HapMap Phase II und III untersucht, zeigte bisher jedoch keine klinische Relevanz. Für *rs10252490* liegen keine vergleichbaren Daten vor.

3.4 PCR-Produkt 13+14 und PCR-Produkt 14

Für die Untersuchung einiger Patientenproben wurden Exon 13 und Exon 14 zu einem PCR-Produkt zusammengefasst (PCR-Produkt 13+14). Später wurden diese Exons getrennt voneinander untersucht (PCR-Produkt 13 und PCR-Produkt 14). PCR-Produkt 13+14 wurde bei 54,1°C, 55,2°C und 56,2°C untersucht, PCR-Produkt 14 bei 54,9°C und 55,9°C. Die Chromatogramme der Patienten 3899 und 4504 zeigten dabei ein auffälliges Profil. In diesen Messreihen konnte man in den Chromatogrammen aller Patienten mehr als einen Peak erkennen. Dennoch war es möglich die auffälligen Chromatogramme von den Kontrollen zu unterscheiden (siehe hierzu: 4.2 Bedeutung zusätzlicher Peaks in Abwesenheit einer Mutation).

^v http://alfred.med.yale.edu/alfred/recordinfo.asp?condition=sites.site_uid=%27SI037950Y

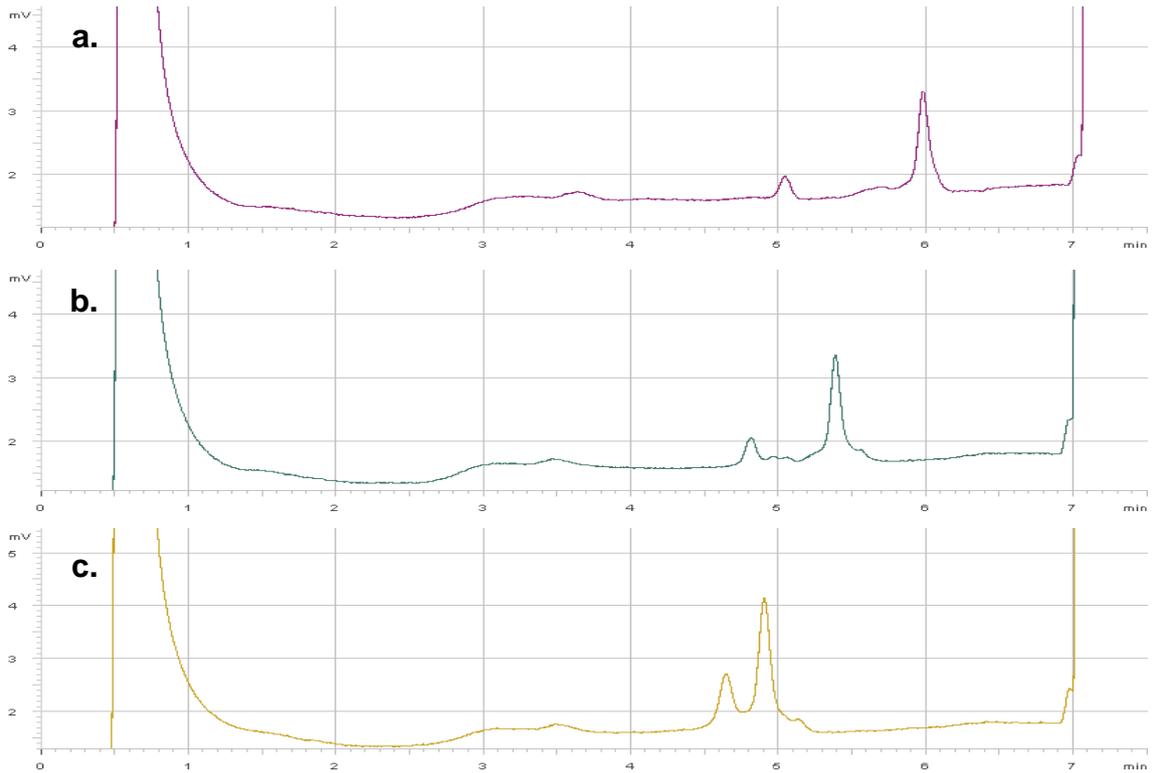


Abbildung 3.11: Chromatogramme von PCR-Produkt 13+14 des Patienten 4504. a. 54,1°C b. 55,2°C c. 56,2°C. Alle Chromatogramme zeigen Doppelpeaks. Der entscheidende Unterschied zu den Vergleichschromatogrammen wird jedoch erst bei 56,2°C erkennbar.

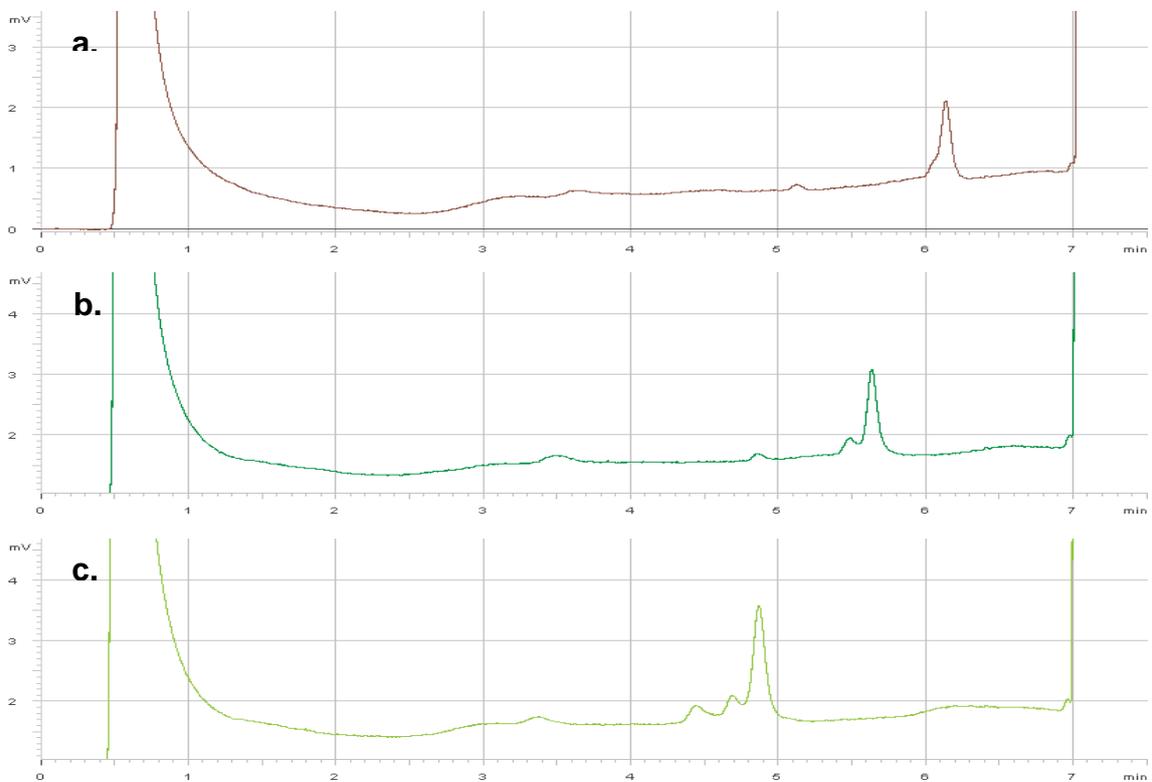


Abbildung 3.12: Vergleichschromatogramme von PCR-Produkt 13+14 (Patient 3021). a. 54,1°C b. 55,2°C c. 56,2°C. Bei 54,1°C und 55,2°C sind angedeutete Doppelpeaks erkennbar, jedoch nicht bei 56,2°C.

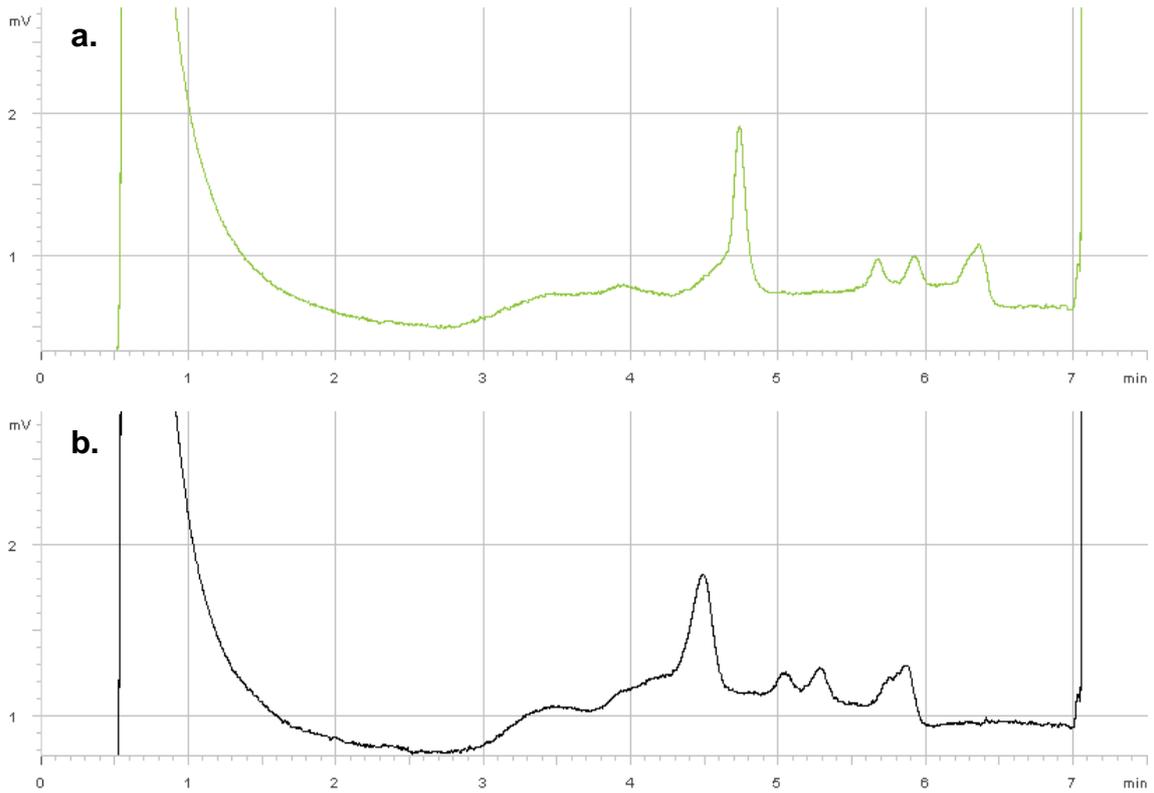


Abbildung 3.13: Chromatogramme von PCR-Produkt 14 des Patienten 3899 a. 54,9°C b. 55,9°C. Beide Chromatogramme zeigen jeweils vier Peaks.

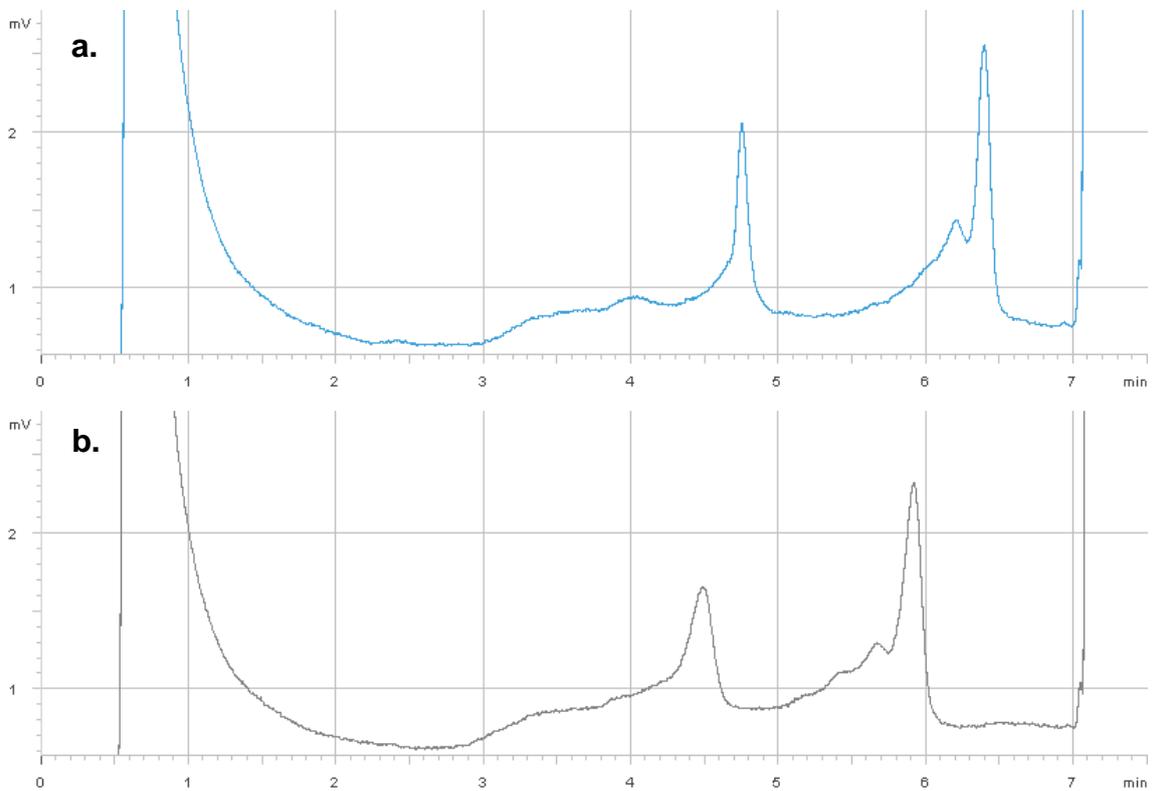


Abbildung 3.14: Vergleichschromatogramme von PCR-Produkt 14 (Patient 4523) a. 54,9°C b. 55,9°C. In beiden Chromatogrammen zeigen sich nur zwei Peaks statt vier.

Die Sequenzierung dieser PCR-Produkte zeigte bei beiden Patienten einen Polymorphismus in der 3'-seitigen nicht translatierten Region (3' UTR) von Exon 14. Es handelte sich um eine Basenaustauschmutation zwischen Guanin und Thyminid (NM_000108.3:c.*28G>T), welche unter der Nummer rs17154615 annotiert ist.

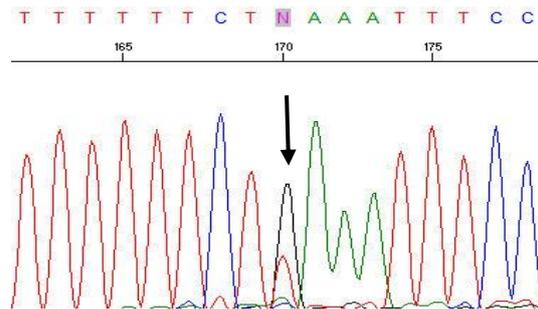


Abbildung 3.15: Guanin/Thyminid Substitution (NM_000108.3:c.*28G>T) bei Patient 3899 (repräsentativ für Patient 4504)

Was die durchschnittliche Heterozygotierate dieses Polymorphismus anbetrifft, so liegen bisher keine schlüssigen Daten vor. Der SNP wurde bereits in Phase II und III des HapMap Projekts untersucht, welches dessen klinische Relevanz bisher jedoch nicht zeigen konnte.

3.5 Zusammenfassung der detektierten Mutationen

Die folgende Tabelle enthält noch einmal zusammenfassende Angaben zur Lokalisation, Nomenklatur und Heterozygotierate der detektierten Mutationen.

Patient	Lokalisation	Mutation	ID: rs#	Heterozygotie
3021	Intron 5	NM_000108.3:c.338-81T>A	-	unbekannt
3448	Intron 6	NM_000108.3:c.439-7T>C	rs10263341	0,332
4367	Intron 6	NM_000108.3:c.439-7T>C	rs10263341	0,332
4479	Intron 6	NM_000108.3:c.439-7T>C	rs10263341	0,332
4512	Intron 6	NM_000108.3:c.439-7T>C	rs10263341	0,332
4573	Intron 6	NM_000108.3:c.439-7T>C	rs10263341	0,332
4527	Intron 8	NM_000108.3:c.684+124A>G	rs10281520	0.401
		NM_000108.3:c.684+189G>C	rs10252490	unklar
4529	Intron 8	NM_000108.3:c.684+124A>G	rs10281520	0.401
		NM_000108.3:c.684+189G>C	rs10252490	unklar
4532	Intron 8	NM_000108.3:c.684+124A>G	rs10281520	0.401
		NM_000108.3:c.684+189G>C	rs10252490	unklar
3899	3' UTR Exon 14	NM_000108.3:c.*28G>T	rs17154615	unklar
4504	3' UTR Exon 14	NM_000108.3:c.*28G>T	rs17154615	unklar

Tabelle 3.1: Zusammenfassung aller Mutationen des untersuchten Patientenkollektives. NM_000108.3 = 3. Version der NCBI Reference Sequence der mRNA der Humanen Dihydropyrimidin-Dehydrogenase, c = Positionsbestimmung der Mutation anhand der cDNA-Sequenz, * = Zählung beginnt mit der ersten Base des 3'-UTR.

4 Diskussion

4.1 Auswahl der Methode

Ein zentraler Teil der vorliegenden Arbeit war die Detektion von Erbgutveränderungen im Gen der Dihydrolipoamid-Dehydrogenase. Das untersuchte Patientenkollektiv umfasste 88 FDC-Patienten. Da das DLD-Gen aus 14 Exons besteht, wurden somit insgesamt 1232 Einzelproben untersucht. Eine alleinige Sequenzierung aller Amplikons wäre daher aus Kosten- und Zeitgründen sehr ineffizient gewesen. Bei Untersuchungen wie dieser ist demnach die Anwendung eines Screeningverfahrens angezeigt. Screeningtests zeichnen sich durch eine hohe Sensitivität bei meist moderater Spezifität aus. Häufig handelt es sich um schnell und kostengünstig durchführbare Tests, deren positive Ergebnisse anschließend durch aufwendigere und genauere Testverfahren überprüft werden müssen [65]. Die Verwendung der DHPLC rechtfertigte sich jedoch nicht nur durch ihre kosteneffiziente und zeitsparende Anwendung, sondern auch aufgrund ihrer hohen Sensitivität bei gleichzeitig hoher Spezifität. In den bisher durchgeführten Untersuchungen lagen Sensitivität und Spezifität der DHPLC nie unter 96% [43]. Für manche Anwendungen wie beispielsweise die Detektion von BRCA1- und BRCA2-Mutationen können Sensitivität und Spezifität der DHPLC sogar bis zu 100% erreichen [66]. Sollte die gesuchte Mutation nur in einer geringen Allelfrequenz vorliegen, wie es zum Beispiel bei genetischen Mosaiken der Fall ist, so kann die DHPLC-Untersuchung sogar genauere Ergebnisse liefern als die direkte Sequenzierung [67]. Bei einer Allelfrequenz von 20%, können somit 100% der Mutationen erfasst werden, während die Erfolgsrate der direkten Sequenzierung bei nur 80% liegt [43, 68]. Die besten Untersuchungsergebnisse liefert die DHPLC bei Fragmentgrößen zwischen 150 und 700 Basenpaaren [43, 48-50]. Die Größen der in der vorliegenden Arbeit untersuchten PCR-Produkte lagen zwischen 227 und 505 Basenpaaren, weshalb sich die DHPLC auch deshalb hervorragend eignete.

Zur Überprüfung der Detektionsverlässlichkeit der DHPLC wurden in regelmäßigen Abständen Testmessungen mit dem *WAVE® Low Range*

Mutation Standard durchgeführt (siehe auch 2.3.3 Analyse der PCR-Produkte). Die Chromatogramme dieser Messungen zeigten stets vier scharf voneinander abgrenzbare Peaks, wodurch die einwandfreie Funktion der DHPLC wiederholt bestätigt wurde. Ein Testlauf mit DNA, die eine bekannte Mutation enthielt (die von der Arbeitsgruppe Zimmer entdeckte Mutation in Exon 2 des DLD-Gens; siehe 1.2 Entdeckung einer neuen DCM-Mutation) führte ebenfalls zu deren zweifelsfreien Detektion. Damit konnte neben der Verlässlichkeit der DHPLC auch die Fehlerfreiheit der vorbereitenden Schritte nachgewiesen werden.

4.2 Bedeutung zusätzlicher Peaks in Abwesenheit einer Mutation

Es kommt gelegentlich vor, dass auch Chromatogramme von DNA-Proben, die keine durch Sequenzierung nachweisbare Mutation enthalten, mehr als einen Peak aufweisen. Dafür gibt es verschiedene Erklärungen. Zum einen ist es möglich, dass heterozygote Mutationen nur in einer sehr geringen Allelfrequenz vorliegen. Solche Mutationen können zwar aufgrund der hohen Sensitivität der DHPLC entdeckt werden, sind zum Teil aber nur schwer durch Sequenzierung nachzuweisen [67, 68]. Des Weiteren können durch unspezifische Primerbindung unterschiedlich große PCR-Produkte entstehen. Da die Laufzeiten über die DHPLC-Säule auch von der Größe des jeweiligen Amplikons abhängen [43], können mehrere Peaks im Chromatogramm erscheinen, wenn sich unterschiedlich große PCR-Produkte in der untersuchten Probe befinden. Darüber hinaus kann es vorkommen, dass die verwendete Polymerase nicht absolut korrekt arbeitet und es somit an manchen Stellen zu einem fehlerhaften Einbau von Basen kommt. Dadurch werden künstlich Punktmutationen erzeugt, welche dann in Form von Heteroduplexen registriert werden [69]. Eine weitere Erklärung kann die Bildung von Primer-Dimeren sein. Diese könnten ebenfalls als zusätzlicher Peak sichtbar sein.

Auch bei der Untersuchung dieses Patientenkollektives kam es zu solchen Phänomenen. Bei den Messreihen von PCR-Produkt 13+14 und PCR-Produkt 14 war in allen untersuchten Proben mehr als ein Peak zu sehen. Die Ursache dafür konnte im Rahmen der oben genannten Möglichkeiten nicht

abschließend geklärt werden, da auch die Gelelektrophorese keine Auffälligkeiten zeigte. Es war jedoch dennoch möglich die mutationstragenden PCR-Produkte zu selektieren. Deren Chromatogramme zeigten nämlich im Vergleich zu den Kontroll-Proben deutliche Unterschiede (siehe Abbildungen 3.11-3.14).

4.3 Bedeutung von Mutationen in Exons und Introns

Die Aminosäuresequenz eines Proteins leitet sich nicht direkt von der Basensequenz des Gens ab, denn 94% aller menschlichen Gene sind diskontinuierlich aufgebaut [70]. Das heißt, die proteinkodierenden Bereiche eines Gens (Exons) sind durch Sequenzabschnitte unterbrochen, die nicht zur Kodierung der Aminosäuresequenz des jeweiligen Proteins beitragen (Introns) [71]. Nach der Transkription werden diese Introns durch einen Vorgang, der *Spleißen* genannt wird, aus der mRNA entfernt. Somit wird nur die Sequenz der Exons im Rahmen der Translation in die Aminosäuresequenz des Proteins übersetzt.

Aus diesen Überlegungen leitet sich ab, dass das Vorkommen von Erbgutveränderungen in Exons und Introns unterschiedlich zu bewerten ist. Wenn man von Exon-Mutationen spricht, sollte man zunächst zwischen synonymen und nicht-synonymen Mutationen unterscheiden. Da es sich beim genetischen Code um einen degenerierten Code handelt [72], führt nicht jede Basenaustauschmutation zu einer Veränderung der Aminosäuresequenz des Proteins. Synonyme Mutationen haben demnach keine Auswirkung auf die Aminosäuresequenz eines Proteins, wohingegen nicht-synonyme Mutationen zum Austausch einer Aminosäure führen. Genmutationen im Exon können also zu direkt nachvollziehbaren Proteinveränderungen führen und damit die Grundlage für viele hereditäre Erkrankungen bilden. Es gibt jedoch Hinweise dafür, dass auch synonyme Genmutationen ein auslösendes Moment bestimmter Erbkrankheiten darstellen können [73].

Obwohl Genmutationen im Bereich von Introns keine Auswirkungen auf die Aminosäuresequenz eines Proteins haben, darf ihr pathogener Einfluss nicht unterschätzt werden. Als pathogene Mechanismen sind beispielsweise

Veränderungen in der Promotor-Region und damit eine Beeinflussung der Genexpression, Konformationsänderungen der mRNA einhergehend mit verminderter translationaler Effizienz sowie Mutationen an Spleißstellen (*engl.: Splice-Sites*) mit Beeinflussung der post-transkriptionalen Modifikation denkbar [73, 74]. Der Einfluss nicht-kodierender Sequenzen auf die Regulation der Genfunktion spielt also auch pathophysiologisch eine erhebliche Rolle. Gestützt wird diese These unter anderem durch die Beobachtung, dass annähernd 40% aller SNPs, die mit bestimmten Merkmalen assoziiert sind, in intergenetischen Bereichen zu finden sind und weitere 40% in Intron-Sequenzen liegen [75].

Die vorliegende Arbeit konzentrierte sich jedoch vornehmlich auf den Nachweis von heterozygoten Mutationen in den Exons der Dihydrolipoamid-Dehydrogenase. Ein Grund dafür ist, dass kodierende Sequenzen einen direkten Einfluss auf die Proteinstruktur nehmen können. Es ist also sinnvoll zunächst nach Mutationen zu suchen, bei deren Vorhandensein ein nachvollziehbares pathologisches Korrelat zu erwarten ist. Außerdem sind sämtliche bisher beschriebenen, DCM-assoziierten Mutationen und fast alle bekannten pathogenen DLD-Mutationen auf Exon-Ebene nachgewiesen worden (siehe Tabelle 1.1 und 1.2). Bei den hier untersuchten DNA-Fragmenten handelte es sich also hauptsächlich um kodierende Sequenzen. Zwangsläufig gingen jedoch die das Exon flankierenden Intron-Abschnitte mit in die Untersuchung ein. Diese Intron-Abschnitte wurden also ebenso auf Mutationen überprüft wie die kodierenden Sequenzen.

4.4 Interpretation der Ergebnisse

Bei der Untersuchung des 88 Patienten umfassenden Kollektives konnten bei elf Patienten insgesamt fünf unterschiedliche Mutationen im Gen der Dihydrolipoamid-Dehydrogenase nachgewiesen werden. Dabei lagen drei Mutationen in nicht näher bezeichneten Intron-Bereichen, eine Mutation in einer 3' Spleißstelle und eine weitere Mutation in der 3' UTR (*engl.: untranslated region*) der mRNA. Bei vier der fünf verschiedenen Mutationen handelte es sich um bereits bekannte SNPs. Eine Mutation ist in der Literatur bisher nicht beschrieben. Um die Auswirkungen dieser Polymorphismen auf den

Organismus zu überprüfen – beziehungsweise deren klinische Relevanz aufzudecken – wurden sie mit der *NCBI SNP Database*^w abgeglichen, welche ständig mit den neuesten Daten des HapMap Projekts^x aktualisiert wird. Wie bereits beschrieben besteht die Aufgabe des HapMap Projekts darin eine Haplotypenkarte der Sequenzvariationen des menschlichen Genoms zu erstellen und somit Assoziationen zwischen Polymorphismen und häufigen klinischen Erscheinungsbildern aufzudecken. Im Folgenden sollen die registrierten Mutationen im Detail besprochen werden (vgl. Tabelle 3.1).

Mutationen in Intron-Bereichen

Bei den Patienten 3021, 4527, 4529 und 4532 konnten drei unterschiedliche Mutationen nachgewiesen werden, die sich in nicht näher bezeichneten Intron-Bereichen befanden. Diese Mutationen lagen zwar in Bereichen, die nicht direkt mit funktionell wichtigen Sequenzen in Verbindung gebracht werden konnten, es ist jedoch bekannt, dass bis zu 40% aller merkmalsbezogenen SNPs in Intron-Bereichen liegen. Daraus lässt sich schließen, dass diesen Sequenzen ein hoher Anteil an der Regulation der Genfunktion beizumessen ist [75] und mögliche pathogene Einflüsse primär nicht auszuschließen sind. Bei zwei der hier beschriebenen Mutationen handelte es um bereits bekannte Einzelnukleotid-Polymorphismen (*NM_000108.3:c.684+124A>G* → *rs10281520*; *NM_000108.3:c.684+189G>C* → *rs10252490*). Wie ein Abgleich dieser SNPs mit den Daten des HapMap Projekts erbrachte, gibt es bisher jedoch keinen Anhalt für eine Assoziation zu einem klinischen Erscheinungsbild.

Bei Patient 3021 konnte eine bisher noch nicht beschriebene Mutation (*NM_000108.3:c.338-81T>A*) nachgewiesen werden. Die Mutation liegt in Intron 5 und ist 81 Basenpaare von Exon 6 entfernt. Damit liegt sie nicht an der Spleißstelle von Exon 6 [27]. Da es bisher keine Daten über diese Mutation gibt, kann eine Beeinflussung der Genfunktion nicht ausgeschlossen werden. Sie erscheint jedoch nicht offensichtlich.

^w <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/index.html>

^x <http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/>

Mutationen an Spleißstellen

Bei den Patienten 3448, 4367, 4479, 4512 und 4573 wurde eine Mutation an einer Spleißstelle in Intron 6 (*NM_000108.3:c.439-7T>C*) nachgewiesen. Die Mutation ist sieben Basenpaare von Exon 7 entfernt und liegt in der 3' Spleißstelle des vorgeschalteten Introns [27]. Mit dem Begriff Spleißstelle werden Sequenzen im Intron-Bereich bezeichnet, die die Grenze des Introns zum Exon markieren. Introns werden demnach von einer 5'- und einer 3' Spleißstelle flankiert. Die Spleißstellen stellen zusammen mit der *branch point sequence* (ein weiteres konserviertes Sequenzelement, etwa 18-40 bp von der 3' Spleißstelle entfernt [74]) die Haupterkennungssequenz für das *Spleißosom* (ein Komplex aus RNA-Molekülen und Ribonukleoproteinen, welches den Spleiß-Vorgang katalysiert) dar [76].

Es wird geschätzt, dass der Spleiß-Vorgang von bis zu 50% aller krankheitserregenden Mutationen beeinflusst wird [70]. Dabei machen Mutationen, die direkt in der Sequenz der Spleißstelle liegen, etwa 10% aller pathogenen Mutationen aus [77]. Solche Mutationen können zu Fehlern beim Spleißen führen. Typische Folgen sind das Überspringen eines Exons, die Aktivierung einer zusätzlichen Spleißstelle oder die Retention eines Introns [70, 74]. Es konnte gezeigt werden, dass Mutationen an Spleißstellen auch bei der Entwicklung der familiären DCM eine Rolle spielen. Eine Mutation in der 5' Spleißstelle des ersten Introns im Dystrophin-Gen führt frühzeitig zur Manifestation einer dilatativen Kardiomyopathie [78, 79]. Was das Gen der Dihydrolipoamid-Dehydrogenase betrifft, so konnten Grafakou et. al zeigen, dass eine Mutation in der 5' Spleißstelle von Intron 9 im Rahmen einer *Compound Heterozygotie* mit einer weiteren Mutation in Exon 11 zu einer E3-Insuffizienz mit der Entwicklung eines Leigh-Syndroms führte [33].

Im vorliegenden Fall handelt es sich um einen bereits bekannten Einzelnukleotid-Polymorphismus (*rs10263341*). Die Pathogenität beziehungsweise klinische Relevanz dieses Polymorphismus konnte zwar bisher nicht aufgezeigt werden, es ist jedoch bekannt, dass SNPs die Effizienz von Spleiß-Vorgängen signifikant beeinflussen können. So weiß man mittlerweile, dass sowohl der Schweregrad bestimmter Erbkrankheiten, wie

auch die Suszeptibilität für verschiedene Erkrankungen durch Polymorphismen an Spleißstellen moduliert werden können [80].

3'UTR Mutationen

Bei den Patienten 3899 und 4504 konnten Mutationen in der 3'UTR der mRNA nachgewiesen werden. Es handelte sich um die Mutation *NM_000108.3:c.*28G>T* – ein bekannter Einzelnukleotid Polymorphismus (*rs17154615*).

Mit dem Begriff UTR (*untranslated region*) bezeichnet man die am 5'- und 3'-Ende der mRNA liegenden Abschnitte, deren Sequenz während der Translation nicht in eine Aminosäuresequenz übersetzt wird. Funktionell sind diese Sequenzen maßgeblich für die Regulation der Genexpression und des Translationsvorgangs verantwortlich. Die Kontrollfunktion der 3'UTRs bezüglich der mRNA spielt sich dabei hauptsächlich auf den folgenden Ebenen ab: Polyadenylierung, Stabilität und Degradation, nukleärer Export, subzelluläre Lokalisation und Translations-Effizienz [81-85]. Dementsprechend können Mutationen in diesen Bereichen zu einer Beeinflussung der Genexpression führen. Es sind bereits verschiedene Erkrankungen bekannt, die mit Mutationen und Polymorphismen in 3'- sowie 5'UTRs assoziiert sind [85, 86]. In diesem Zusammenhang soll darauf hingewiesen werden, dass es auch Hinweise für eine Assoziation der dilatativen Kardiomyopathie mit dem Vorhandensein von Polymorphismen in UTRs gibt. Zhou et al. konnten zeigen, dass ein bestimmter Polymorphismus in der 3'UTR des RTN4 Gens in einer Gruppe mit DCM-Patienten signifikant häufiger vorkommt als in einer gesunden Kontrollgruppe [87]. Das besagte Gen kodiert für das Protein Nogo, dessen Isoformen in vielen Geweben, insbesondere im Muskel und im zentralen Nervensystem exprimiert werden [88].

Was den hier besprochenen Polymorphismus *rs17154615* angeht, so konnte bisher keine klinische Assoziation mit dessen Auftreten hergestellt werden.

Vor dem Hintergrund der Entdeckung eines neuen DCM-Locus im Gen der Dihydrolipoamid-Dehydrogenase befasste sich die vorliegende Arbeit mit der Suche nach Erbgutveränderungen in den Exons der DLD bei Patienten mit familiärer dilatativer Kardiomyopathie. Es sollte überprüft werden, ob es weitere Hinweise für eine Assoziation dieses Gens mit dem Auftreten einer familiären DCM gibt.

Wie sich zeigte, konnte bei dem 88 Patienten umfassenden Kollektiv keine Mutation in proteinkodierenden Sequenzbereichen nachgewiesen werden. Des Weiteren ergab die Überprüfung der durchschnittlichen Heterozygotieraten der nachgewiesenen SNPs (siehe Tabelle 3.1), dass sie in der untersuchten Patientengruppe nicht gehäuft auftraten. Der Abgleich mit den Daten des HapMap Projekts zeigte für keinen der SNPs eine nachgewiesene klinische Assoziation. Die Identität einer Mutation in Intron 5 konnte nicht abschließend geklärt werden. Diese Mutation liegt jedoch nicht in einer Region, die für die Regulation der Genfunktion bekannt ist. Es ließen sich also für keine der detektierten Mutationen pathogene Eigenschaften nachweisen.

Zusammenfassend kann also festgehalten werden, dass eine Assoziation zwischen Mutationen des DLD-Gens und dem Auftreten einer familiären DCM in dieser Arbeit nicht bestätigt werden konnte. Es ist denkbar, dass DCM-assoziierte Mutationen im DLD-Gen äußerst selten sind und somit nicht erfasst wurden. Des Weiteren ist es möglich, dass die von der Arbeitsgruppe Zimmer entdeckte Mutation die bisher einzige DCM-assoziierte Mutation im DLD-Gen ist. Um diese Frage zu klären müssen Untersuchungen mit größeren Patientenkollektiven angeschlossen werden.

5 Zusammenfassung

Die Arbeitsgruppe Zimmer am Institut für Klinische Biochemie und Pathobiochemie der Universität Würzburg detektierte im Gen der Dihydrolipoamid-Dehydrogenase (DLD) eine bisher nicht bekannte Mutation, die für die Entwicklung einer familiären Form der dilatativen Kardiomyopathie (DCM) verantwortlich ist. Die DLD spielt als Teil von mitochondrialen Enzymkomplexen eine wichtige Rolle im Energie- und Aminosäurestoffwechsel der Zelle. Mutationen im DLD-Gen führen dabei meist zu neurologischen Syndromen mit Erscheinungsbildern wie mentaler Entwicklungsverzögerung, Krampfanfällen und spastischen Bewegungsstörungen. Fälle von Herzinsuffizienz und frühkindlicher Hypertropher Kardiomyopathie wurden ebenfalls beschrieben. Von den zahlreichen Gendefekten, die als Auslöser für die dilatative Kardiomyopathie bekannt sind, ist bisher noch keiner im Gen der DLD beschrieben worden. Vielmehr sind DCM-Mutationen in Genen zu finden, die für muskelspezifische Proteine kodieren. Dadurch führen sie oft zu einer Beeinflussung der Kraftübertragung im Sarkomer. Die durch die Arbeitsgruppe Zimmer beschriebene DLD-Mutation wurde in einer portugiesischen Großfamilie entdeckt, in welcher das Auftreten der dilatativen Kardiomyopathie über mehrere Generationen hinweg zu verfolgen ist. Ähnliche Fälle außerhalb dieser Familie sind nicht bekannt. Demnach gibt es keine Daten, die die Häufigkeit DCM-assoziiierter Mutationen im Gen der Dihydrolipoamid-Dehydrogenase beschreiben. Die vorliegende Arbeit beschäftigte sich damit weitere Zusammenhänge zwischen genetischen Alterationen im DLD-Gen und dem Auftreten einer DCM aufzudecken.

In diesem Rahmen wurden DCM-Patienten, die erwiesenermaßen an einer familiären Form dieser Erkrankung leiden, gezielt auf Veränderungen in den Exons des DLD-Gens untersucht. Insgesamt wurden die Exons von 88 Patienten auf das Vorhandensein heterozygoter Mutationen überprüft. Hierfür wurden PCR-Produkte, die die jeweiligen Exons enthielten, mit Hilfe der Denaturing High-Performance Liquid Chromatography (DHPLC) untersucht. Diese Methode ermöglicht eine hochsensitive und gleichermaßen äußerst

spezifische Detektion heterozygoter Mutationen. Auffällige Ergebnisse wurden anschließend mittels Sequenzierung verifiziert.

Insgesamt wurden bei elf Patienten fünf unterschiedliche Mutationen nachgewiesen. Es handelte sich um vier bereits bekannte Einzelnukleotid-Polymorphismen und eine bisher nicht beschriebene Mutation. Dabei lagen vier Mutationen in nicht näher bezeichneten Intron-Bereichen, eine Mutation in einer 3' Spleißstelle und eine weitere Mutation in der 3' UTR (*untranslated region*) der mRNA. Somit befanden sich also einige Mutationen an für die Regulation der Genfunktion strategisch wichtigen Positionen. Da es sich dabei um bekannte Polymorphismen handelte, wurde mit Hilfe der Daten des HapMap Projekts überprüft, ob es bereits Hinweise für eine klinische Assoziation gab. Die Daten zeigten, dass bisher keiner der hier detektierten SNPs mit klinischen Erscheinungsbildern in Verbindung gebracht werden konnte. Es gab auch keine Hinweise dafür, dass die erfassten SNPs im Patientenkollektiv häufiger vorkamen als in der Normalbevölkerung. Einer der hier beschriebenen Mutationen war nicht in den verwendeten Datenbanken aufgeführt. Daher kann ein pathologischer Einfluss dieser Mutation zwar nicht ausgeschlossen werden, erscheint aber aufgrund ihrer Lage in einem weit vom Exon entfernten Intron-Bereich nicht offensichtlich. Es ließen sich also für keine der detektierten Mutationen pathogene Eigenschaften nachweisen. In Protein-kodierenden Sequenzbereichen konnten keine Mutationen nachgewiesen werden.

Abschließend lässt sich also sagen, dass eine Assoziation zwischen Mutationen im DLD-Gen und dem Auftreten einer familiären DCM im Rahmen dieser Arbeit nicht bestätigt werden konnte. Es ist jedoch möglich, dass DCM-assoziierte Mutationen im DLD-Gen nur äußerst selten auftreten oder aber die durch die Arbeitsgruppe Zimmer detektierte Mutation im DLD-Gen die bisher einzige ist, die mit DCM in Verbindung gebracht werden kann. Um diese Frage zu klären müssen Untersuchungen mit größeren Patientenkollektiven angeschlossen werden.

6 Literatur- und Abbildungsverzeichnis

1. Herold, G., *Innere Medizin*. 2010, Köln: Herold, Gerd.
2. Pankuweit, S., et al., [*Classification, genetic predisposition and risk factors for the development of cardiomyopathies*]. *Internist (Berl)*, 2008. **49**(4): S. 441-2, 444-7.
3. Elliott, P., et al., *Classification of the cardiomyopathies: a position statement from the European Society Of Cardiology Working Group on Myocardial and Pericardial Diseases*. *Eur Heart J*, 2008. **29**(2): S. 270-6.
4. Dec, G.W. and V. Fuster, *Idiopathic dilated cardiomyopathy*. *N Engl J Med*, 1994. **331**(23): S. 1564-75.
5. Codd, M.B., et al., *Epidemiology of idiopathic dilated and hypertrophic cardiomyopathy. A population-based study in Olmsted County, Minnesota, 1975-1984*. *Circulation*, 1989. **80**(3): S. 564-72.
6. Komajda, M., et al., *Factors predicting mortality in idiopathic dilated cardiomyopathy*. *Eur Heart J*, 1990. **11**(9): S. 824-31.
7. Mestroni, L., et al., *Guidelines for the study of familial dilated cardiomyopathies. Collaborative Research Group of the European Human and Capital Mobility Project on Familial Dilated Cardiomyopathy*. *Eur Heart J*, 1999. **20**(2): S. 93-102.
8. Burkett, E.L. and R.E. Hershberger, *Clinical and genetic issues in familial dilated cardiomyopathy*. *J Am Coll Cardiol*, 2005. **45**(7): S. 969-81.
9. Osterziel, K.J., et al., [*Familial dilated cardiomyopathy*]. *Herz*, 2005. **30**(6): S. 529-34.

10. Somech, R., et al., *Nuclear envelopathies--raising the nuclear veil*. *Pediatr Res*, 2005. **57**(5 Pt 2): S. 8R-15R.
11. Wolf, C.M., et al., *Lamin A/C haploinsufficiency causes dilated cardiomyopathy and apoptosis-triggered cardiac conduction system disease*. *J Mol Cell Cardiol*, 2008. **44**(2): S. 293-303.
12. Fatkin, D., et al., *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*, 1999. **341**(23): S. 1715-24.
13. Perrot, A., et al., *Identification of mutational hot spots in LMNA encoding lamin A/C in patients with familial dilated cardiomyopathy*. *Basic Res Cardiol*, 2009. **104**(1): S. 90-9.
14. Dalakas, M.C., et al., *Desmin myopathy, a skeletal myopathy with cardiomyopathy caused by mutations in the desmin gene*. *N Engl J Med*, 2000. **342**(11): S. 770-80.
15. Löffler, G., *Basiswissen Biochemie mit Pathobiochemie*, ed. G. Löffler. Vol. 6. 2005, Heidelberg: Springer Medizin Verlag Heidelberg. 818.
16. Chang, A.N. and J.D. Potter, *Sarcomeric protein mutations in dilated cardiomyopathy*. *Heart Fail Rev*, 2005. **10**(3): S. 225-35.
17. Olson, T.M., et al., *Mutations that alter the surface charge of alpha-tropomyosin are associated with dilated cardiomyopathy*. *J Mol Cell Cardiol*, 2001. **33**(4): S. 723-32.
18. Kamisago, M., et al., *Mutations in sarcomere protein genes as a cause of dilated cardiomyopathy*. *N Engl J Med*, 2000. **343**(23): S. 1688-96.

19. Hershberger, R.E., et al., *Progress with genetic cardiomyopathies: screening, counseling, and testing in dilated, hypertrophic, and arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy*. *Circ Heart Fail*, 2009. **2**(3): S. 253-61.
20. Mestroni, L., et al., *Familial dilated cardiomyopathy: evidence for genetic and phenotypic heterogeneity*. *Heart Muscle Disease Study Group*. *J Am Coll Cardiol*, 1999. **34**(1): S. 181-90.
21. Pasotti, M., et al., *Long-term outcome and risk stratification in dilated cardiomyopathies*. *J Am Coll Cardiol*, 2008. **52**(15): S. 1250-60.
22. Schönberger, J., et al., *A novel locus for autosomal-dominant dilated cardiomyopathy maps to chromosome 7q22.3-31.1*. *Hum Genet*, 2005. **118**(3-4): S. 451-7.
23. Kühler, L., *Identifizierung Genetischer Defekte der Familiären Dilatativen Kardiomyopathie*, in *Institut für Klinische Biochemie und Pathobiochemie*. 2007, Julius-Maximilians-Universität Würzburg: Würzburg.
24. Horwich, A.L., et al., *A leader peptide is sufficient to direct mitochondrial import of a chimeric protein*. *EMBO J*, 1985. **4**(5): S. 1129-35.
25. Maric, H., *Funktionelle charakterisierung einer Mutationsvariante des Signalpeptids der Dihydrolipoamid-dehydrogenase (DLD)*, in *Fakultät für Chemie und Pharmazie*. 2008, Julius-Maximilians-Universität: Würzburg.
26. Scherer, S.W., et al., *Localization of the human dihydrolipoamide dehydrogenase gene (DLD) to 7q31----q32*. *Cytogenet Cell Genet*, 1991. **56**(3-4): S. 176-7.

27. Feigenbaum, A.S. and B.H. Robinson, *The structure of the human dihydrolipoamide dehydrogenase gene (DLD) and its upstream elements*. Genomics, 1993. **17**(2): S. 376-81.
28. Pons, G., et al., *Cloning and cDNA sequence of the dihydrolipoamide dehydrogenase component human alpha-ketoacid dehydrogenase complexes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1988. **85**(5): S. 1422-6.
29. Carothers, D.J., G. Pons, and M.S. Patel, *Dihydrolipoamide dehydrogenase: functional similarities and divergent evolution of the pyridine nucleotide-disulfide oxidoreductases*. Arch Biochem Biophys, 1989. **268**(2): S. 409-25.
30. Kikuchi, G., et al., *Glycine cleavage system: reaction mechanism, physiological significance, and hyperglycinemia*. Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci, 2008. **84**(7): S. 246-63.
31. Odievre, M.H., et al., *A novel mutation in the dihydrolipoamide dehydrogenase E3 subunit gene (DLD) resulting in an atypical form of alpha-ketoglutarate dehydrogenase deficiency*. Hum Mutat, 2005. **25**(3): S. 323-4.
32. Shany, E., et al., *Lipoamide dehydrogenase deficiency due to a novel mutation in the interface domain*. Biochem Biophys Res Commun, 1999. **262**(1): S. 163-6.
33. Grafakou, O., et al., *Leigh syndrome due to compound heterozygosity of dihydrolipoamide dehydrogenase gene mutations. Description of the first E3 splice site mutation*. Eur J Pediatr, 2003. **162**(10): S. 714-8.
34. Cameron, J.M., et al., *Novel mutations in dihydrolipoamide dehydrogenase deficiency in two cousins with borderline-normal PDH complex activity*. Am J Med Genet A, 2006. **140**(14): S. 1542-52.

35. Liu, T.C., et al., *Identification of two missense mutations in a dihydrolipoamide dehydrogenase-deficient patient*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(11): S. 5186-90.
36. Hong, Y.S., et al., *Identification of two mutations in a compound heterozygous child with dihydrolipoamide dehydrogenase deficiency*. Hum Mol Genet, 1996. **5**(12): S. 1925-30.
37. Hong, Y.S., et al., *Deficiency of dihydrolipoamide dehydrogenase due to two mutant alleles (E340K and G101del). Analysis of a family and prenatal testing*. Biochim Biophys Acta, 1997. **1362**(2-3): S. 160-8.
38. Shaag, A., et al., *Molecular basis of lipoamide dehydrogenase deficiency in Ashkenazi Jews*. Am J Med Genet, 1999. **82**(2): S. 177-82.
39. Cerna, L., et al., *Novel mutations in a boy with dihydrolipoamide dehydrogenase deficiency*. Med Sci Monit, 2001. **7**(6): S. 1319-25.
40. Oefner, P.J., Underhill PA., *Detection of nucleic acid heteroduplex molecules by denaturing high-performance liquid chromatography and methods for comparative sequencing*. 1998. US Patent 5,795,976.
41. Aboul-ela, F., et al., *Base-base mismatches. Thermodynamics of double helix formation for dCA3XA3G + dCT3YT3G (X, Y = A,C,G,T)*. Nucleic Acids Res, 1985. **13**(13): S. 4811-24.
42. Ke, S.H. and R.M. Wartell, *Influence of nearest neighbor sequence on the stability of base pair mismatches in long DNA; determination by temperature-gradient gel electrophoresis*. Nucleic Acids Res, 1993. **21**(22): S. 5137-43.
43. Xiao, W. and P.J. Oefner, *Denaturing high-performance liquid chromatography: A review*. Hum Mutat, 2001. **17**(6): S. 439-74.

44. Hunter, C.A. and X.J. Lu, *DNA base-stacking interactions: a comparison of theoretical calculations with oligonucleotide X-ray crystal structures*. J Mol Biol, 1997. **265**(5): S. 603-19.
45. Hunt, R., et al., *Silent (synonymous) SNPs: should we care about them?* Methods Mol Biol, 2009. **578**: S. 23-39.
46. *The International HapMap Project*. Nature, 2003. **426**(6968): S. 789-96.
47. Frazer, K.A., et al., *A second generation human haplotype map of over 3.1 million SNPs*. Nature, 2007. **449**(7164): S. 851-61.
48. O'Donovan, M.C., et al., *Blind analysis of denaturing high-performance liquid chromatography as a tool for mutation detection*. Genomics, 1998. **52**(1): S. 44-9.
49. Wagner, T., et al., *Denaturing high-performance liquid chromatography detects reliably BRCA1 and BRCA2 mutations*. Genomics, 1999. **62**(3): S. 369-76.
50. Liu, W., et al., *Denaturing high performance liquid chromatography (DHPLC) used in the detection of germline and somatic mutations*. Nucleic Acids Res, 1998. **26**(6): S. 1396-400.
51. Lottspeich, F., *Bioanalytik*. 2. Aufl.. ed. 2006, Heidelberg {[u.a.]}: Spektrum, Akad. Verl. XXIV, 1119 S.
52. Don, R.H., et al., *'Touchdown' PCR to circumvent spurious priming during gene amplification*. Nucleic Acids Res, 1991. **19**(14): S. 4008.
53. Korbie, D.J. and J.S. Mattick, *Touchdown PCR for increased specificity and sensitivity in PCR amplification*. Nat Protoc, 2008. **3**(9): S. 1452-6.

54. Takahashi, M., T. Ogino, and K. Baba, *Estimation of relative molecular length of DNA by electrophoresis in agarose gel*. *Biochim Biophys Acta*, 1969. **174**(1): S. 183-7.
55. Stellwagen, N.C., *Electrophoresis of DNA in agarose gels, polyacrylamide gels and in free solution*. *Electrophoresis*, 2009. **30 Suppl 1**: S. 188-95.
56. Sambrook J., R.D.W., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Vol. 3. 2001, New York: Cold Spring Harbor Press.
57. Borst, P., *Ethidium DNA agarose gel electrophoresis: how it started*. *IUBMB Life*, 2005. **57**(11): S. 745-7.
58. Lehman, I.R. and A.L. Nussbaum, *The Deoxyribonucleases of Escherichia Coli. V. On the Specificity of Exonuclease I (Phosphodiesterase)*. *J Biol Chem*, 1964. **239**: S. 2628-36.
59. Rina, M., et al., *Alkaline phosphatase from the Antarctic strain TAB5. Properties and psychrophilic adaptations*. *Eur J Biochem*, 2000. **267**(4): S. 1230-8.
60. Antonarakis, S.E., *Recommendations for a nomenclature system for human gene mutations*. *Nomenclature Working Group*. *Hum Mutat*, 1998. **11**(1): S. 1-3.
61. den Dunnen, J.T. and S.E. Antonarakis, *Nomenclature for the description of human sequence variations*. *Hum Genet*, 2001. **109**(1): S. 121-4.
62. Osier, M.V., et al., *ALFRED: An allele frequency database for anthropology*. *Am J Phys Anthropol*, 2002. **119**(1): S. 77-83.

63. Rajeevan, H., et al., *ALFRED: the ALlele FREquency Database. Update*. Nucleic Acids Res, 2003. **31**(1): S. 270-1.
64. Osterziel, K.J., et al., *[Genetics of dilated cardiomyopathy]*. Z Kardiol, 2001. **90**(7): S. 461-9.
65. Blood, D.C., *Saunders Comprehensive Veterinary Dictionary (Soft Cover), 3rd Edition*. 2007: Saunders Ltd.
66. Arnold, N., et al., *A highly sensitive, fast, and economical technique for mutation analysis in hereditary breast and ovarian cancers*. Hum Mutat, 1999. **14**(4): S. 333-9.
67. Jones, A.C., J.R. Sampson, and J.P. Cheadle, *Low level mosaicism detectable by DHPLC but not by direct sequencing*. Hum Mutat, 2001. **17**(3): S. 233-4.
68. Kwok, P.Y., et al., *Increasing the information content of STS-based genome maps: identifying polymorphisms in mapped STSs*. Genomics, 1996. **31**(1): S. 123-6.
69. Abbas, A., et al., *Assessment of DHPLC usefulness in the genotyping of GSTP1 exon 5 SNP: comparison to the PCR-RFLP method*. J Biochem Biophys Methods, 2004. **59**(2): S. 121-6.
70. Ward, A.J. and T.A. Cooper, *The pathobiology of splicing*. J Pathol, 2010. **220**(2): S. 152-63.
71. Gilbert, W., *Why genes in pieces?* Nature, 1978. **271**(5645): S. 501.
72. Agris, P.F., *Decoding the genome: a modified view*. Nucleic Acids Res, 2004. **32**(1): S. 223-38.

73. Shastry, B.S., *SNPs: impact on gene function and phenotype*. *Methods Mol Biol*, 2009. **578**: S. 3-22.
74. Krawczak, M., J. Reiss, and D.N. Cooper, *The mutational spectrum of single base-pair substitutions in mRNA splice junctions of human genes: causes and consequences*. *Hum Genet*, 1992. **90**(1-2): S. 41-54.
75. Manolio, T.A., *Genomewide association studies and assessment of the risk of disease*. *N Engl J Med*, 2010. **363**(2): S. 166-76.
76. Wang, Z. and C.B. Burge, *Splicing regulation: from a parts list of regulatory elements to an integrated splicing code*. *RNA*, 2008. **14**(5): S. 802-13.
77. Krawczak, M., et al., *Single base-pair substitutions in exon-intron junctions of human genes: nature, distribution, and consequences for mRNA splicing*. *Hum Mutat*, 2007. **28**(2): S. 150-8.
78. Milasin, J., et al., *A point mutation in the 5' splice site of the dystrophin gene first intron responsible for X-linked dilated cardiomyopathy*. *Hum Mol Genet*, 1996. **5**(1): S. 73-9.
79. Obler, D., et al., *Familial dilated cardiomyopathy secondary to dystrophin splice site mutation*. *J Card Fail*, 2010. **16**(3): S. 194-9.
80. Wang, G.S. and T.A. Cooper, *Splicing in disease: disruption of the splicing code and the decoding machinery*. *Nat Rev Genet*, 2007. **8**(10): S. 749-61.
81. Zhao, J., L. Hyman, and C. Moore, *Formation of mRNA 3' ends in eukaryotes: mechanism, regulation, and interrelationships with other steps in mRNA synthesis*. *Microbiol Mol Biol Rev*, 1999. **63**(2): S. 405-45.

82. Conne, B., A. Stutz, and J.D. Vassalli, *The 3' untranslated region of messenger RNA: A molecular 'hotspot' for pathology?* Nat Med, 2000. **6**(6): S. 637-41.
83. Mignone, F., et al., *Untranslated regions of mRNAs*. Genome Biol, 2002. **3**(3): S. REVIEWS0004.
84. Chabanon, H., I. Mickleburgh, and J. Hesketh, *Zipcodes and postage stamps: mRNA localisation signals and their trans-acting binding proteins*. Brief Funct Genomic Proteomic, 2004. **3**(3): S. 240-56.
85. Chen, J.M., C. Ferec, and D.N. Cooper, *A systematic analysis of disease-associated variants in the 3' regulatory regions of human protein-coding genes I: general principles and overview*. Hum Genet, 2006. **120**(1): S. 1-21.
86. Chatterjee, S. and J.K. Pal, *Role of 5'- and 3'-untranslated regions of mRNAs in human diseases*. Biol Cell, 2009. **101**(5): S. 251-62.
87. Zhou, B., et al., *The association between dilated cardiomyopathy and RTN4 3'UTR insertion/deletion polymorphisms*. Clin Chim Acta, 2009. **400**(1-2): S. 21-4.
88. GrandPre, T., et al., *Identification of the Nogo inhibitor of axon regeneration as a Reticulon protein*. Nature, 2000. **403**(6768): S. 439-44.

Internetverzeichnis

Baylor College of Medicine, Human Genome Sequencing Center: HapMap 3 and ENCODE 3. Online im Internet:

URL: <http://www.hgsc.bcm.tmc.edu/project-medseq-hm-hapmap3encode3.hgsc?pageLocation=hapmap3encode3>
(Stand 22.08.2011)

Coriell Institute for Medical Research: International HapMap Project. Online im Internet:

URL: <http://ccr.coriell.org/Sections/Collections/NHGRI/hapmap.aspx?PgId=266&coll=HG> (Stand 22.08.2011)

Echo in context. Echo in context 2002: Broadcast supplements: The Pathology of Systolic and Diastolic Heart Failure. Online im Internet:

URL: <http://www.echoincontext.com/2002tele/pathologySupp.asp>
(Stand 22.08.2011)

Ensemble Genome Browser , Gene: DLD (ENSG00000091140). Online im Internet:

URL: http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Summary?g=ENSG00000091140 (Stand 22.08.2011)

Ensemble Genome Browser, Transcript: DLD-001 (ENST00000205402). Online im Internet:

URL: http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Transcript/Exons?db=core;g=ENSG00000091140;r=7:107531415-107572175;t=ENST00000205402
(Stand 22.08.2011)

International HapMap Project. Online im Internet:

URL: <http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/> (Stand 22.08.2011)

Kardiologische Gemeinschaftspraxis an der Rheinklinik.
Ultraschalluntersuchung des Herzens: **a.** Ultraschalluntersuchung eines normalen Herzens. **b.** Ultraschalluntersuchung bei einer Herzmuskelerkrankung (dilatativer Kardiomyopathie) mit deutlich vergrößerten Herzkammern. Online im Internet:

URL:<http://www.cardiologie-rheinklinik.de/5100459977124bf52/5100459977125bf5f/index.html> (Stand 22.08.2011)

NCBI, dbSNP Short Genetic Variations. Online im Internet:

URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/index.html>
(Stand 22.08.2011)

New England Biolabs, Antarctic Phosphatase. Online im Internet:

URL: http://www.neb.com/nebecomm/products_intl/productm0289.asp
(Stand 22.08.2011)

New England Biolabs, Exonuclease I. Online im Internet:

URL: <http://www.neb.com/nebecomm/products/productM0293.asp>
(Stand 22.08.2011)

Primer 3 Homepage. Online im Internet:

URL: <http://frodo.wi.mit.edu/> (Stand 22.08.2011)

The Allele Frequency Database. Online im Internet:

URL: <http://alfred.med.yale.edu> (Stand 22.08.2011)

The Allele Frequency Database: Polymorphism Information rs10263341. Online im Internet:

URL: http://alfred.med.yale.edu/alfred/recordinfo.asp?condition=sites.site_uid=%27SI036630S (Stand 22.08.2011)

The Allele Frequency Database: Polymorphism Information rs10281520. Online im Internet:

URL: http://alfred.med.yale.edu/alfred/recordinfo.asp?condition=sites.site_uid=%27SI037950Y (Stand 22.08.2011)

TINT. Nuclear Science and Technology Knowledge Center. Heteroduplex. Online im Internet:

URL: <http://www.tint.or.th/nkc/nkc52/nstkc009.html> (Stand 22.08.2011)

Transgenomic®. Material Safety Data Sheet Nr. MSD-560077. Online im Internet:

URL: <http://www.transgenomic.com/lib/msds/560077.pdf>
(Stand 22.08.2011)

Transgenomic®. System and Accessories Overview, Science: The DHPLC Process. Online im Internet:

URL: <http://www.transgenomic.com/pd/Systems.asp?tab=2>
(Stand 22.08.2011)

Transgenomic®. WAVE® Sizing Standards & Mutation Standards, Ordering. Online im Internet:

URL: <http://www.transgenomic.com/pd/biocon/standards.asp?tab=3>
(Stand 22.08.2011)

Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1.1: Kardiologische Gemeinschaftspraxis an der Rheinklinik. Ultraschalluntersuchung des Herzens: **a.** Ultraschalluntersuchung eines normalen Herzens. **b.** Ultraschalluntersuchung bei einer Herzmuskelerkrankung (dilatativer Kardiomyopathie) mit deutlich vergrößerten Herzkammern. Online im Internet:
URL: <http://www.cardiologie-rheinklinik.de/5100459977124bf52/5100459977125bf5f/index.html> (Stand 22.08.2011)
- Abb. 1.2: Elliott, P., et al., *Classification of the cardiomyopathies: a position statement from the European Society Of Cardiology Working Group on Myocardial and Pericardial Diseases*. Eur Heart J, 2008. **29**(2): p. 270-6.
- Abb. 1.3: Echo in context. Echo in context 2002: Broadcast supplements: The Pathology of Systolic and Diastolic Heart Failure. Online im Internet:
URL: <http://www.echoincontext.com/2002tele/pathologySupp.asp> (Stand 22.08.2011)
- Abb. 1.4: Dalakas, M.C., et al., *Desmin myopathy, a skeletal myopathy with cardiomyopathy caused by mutations in the desmin gene*. N Engl J Med, 2000. **342**(11): p. 770-80.
- Abb. 1.5: Kamisago, M., et al., *Mutations in sarcomere protein genes as a cause of dilated cardiomyopathy*. N Engl J Med, 2000. **343**(23): p. 1688-96.
- Abb. 1.6: Christian Möller, *DLD-Enzymkomplexe*. Unveröffentlicht, 2011

- Abb. 1.7: TINT Nuclear Science and Technology Knowledge Center. Heteroduplex. Online im Internet:
URL: <http://www.tint.or.th/nkc/nkc52/nstkc009.html>
(Stand 22.08.2011)
- Abb. 1.8: **a.** Christian Möller, *Triethylammonium-Ion*. Unveröffentlicht, 2010.
b. Transgenomic® System and Accessories Overview, Science: The DHPLC Process. Online im Internet:
URL: <http://www.transgenomic.com/pd/Systems.asp?tab=2>
(Stand 22.08.2011)
- Abb. 1.9: Christian Möller, *Chromatogramm mit Einzelpeak bei der Detektion eines Homoduplexes*. Unveröffentlicht, 2010
- Abb. 1.10: Xiao, W. and P.J. Oefner, *Denaturing high-performance liquid chromatography: A review*. Hum Mutat, 2001. **17**(6): p. 439-74.
- Abb. 2.1: Christian Möller, *Schematische Darstellung der ersten beiden Zyklen einer PCR*. Unveröffentlicht, 2010
- Abb. 2.2: Christian Möller, *Benutzeroberfläche der Transgenomic Navigator™ Software am Beispiel von DLD-Exon 2*. Unveröffentlicht, 2010
- Abb. 3.1: Christian Möller, *Agarose-Gelelektrophorese aller DLD-Exonabschnitte*. Unveröffentlicht, 2011
- Abb. 3.2: Christian Möller, *Chromatogramme von PCR-Produkt 6 des Patienten 3021*. Unveröffentlicht, 2010
- Abb. 3.3: Christian Möller, *Unauffällige Vergleichschromatogramme von PCR-Produkt 6 (Patient 3069)*. Unveröffentlicht, 2011

- Abb. 3.4: Christian Möller, *Thymidin/Adenin-Substitution (NM_000108.3:c.338-81T>A) bei Patient 3021*. Unveröffentlicht, 2010
- Abb. 3.5: Christian Möller, *Chromatogramme von PCR-Produkt 7 des Patienten 4573 (repräsentativ für Patient 3448, 4367, 4479, 4512)*. Unveröffentlicht, 2010
- Abb. 3.6: Christian Möller, *Unauffällige Vergleichschromatogramme von PCR-Produkt 7 (Patient 4528)*. Unveröffentlicht, 2010
- Abb. 3.7: Christian Möller, *Thymidin/Cytosin-Substitution (NM_000108.3:c.439-7T>C) bei Patient 4573 (repräsentativ für Patient 3448, 4367, 4479, 4512)*. Unveröffentlicht, 2010
- Abb. 3.8: Christian Möller, *Chromatogramme von PCR-Produkt 8 des Patienten 4527 (repräsentativ für Patient 4529 und 4532)*. Unveröffentlicht, 2010
- Abb. 3.9: Christian Möller, *Unauffällige Vergleichschromatogramme von PCR-Produkt 8 (Patient 4515)*. Unveröffentlicht, 2010
- Abb. 3.10: Christian Möller, **a.** *Adenin/Guanin Transition (NM_000108.3:c.684+124A>G)* **b.** *Guanin/Cytosin Transversion (NM_000108.3:c.684+189G>C) in PCR-Produkt 8 bei Patient 4527 (repräsentativ für Patient 4529 und 4532)*. Unveröffentlicht, 2010
- Abb. 3.11: Christian Möller, *Chromatogramme von PCR-Produkt 13+14 des Patienten 4504*. Unveröffentlicht, 2010
- Abb. 3.12: Christian Möller, *Vergleichschromatogramme von PCR-Produkt 13+14 (Patient 3021)*. Unveröffentlicht, 2010

Abb. 3.13: Christian Möller, *Chromatogramme von PCR-Produkt 14 des Patienten 3899*. Unveröffentlicht, 2010

Abb. 3.14: Christian Möller, *Vergleichschromatogramme von PCR-Produkt 14 (Patient 4523)*. Unveröffentlicht, 2010

Abb. 3.15: Christian Möller, *Guanin/Thymidin Substitution (NM_000108.3:c.*28G>T) bei Patient 3899 (repräsentativ für Patient 4504)*. Unveröffentlicht, 2010

Danksagung

Zuerst möchte ich Prof. Dr. Michael Zimmer für die Bereitstellung und fachliche Betreuung meiner Arbeit und die Korrektur der zahlreichen Vorabversionen danken. Vielen Dank für die freundschaftliche und motivierende Atmosphäre in der diese Arbeit entstand.

Ich danke meinen Kollegen Hans Maric, Martin Graf und Veit Althoff, die mir stets mit hilfreichen Tipps und Ratschlägen zur Seite standen. Darüber hinaus danke ich ihnen für das einzigartige Arbeitsklima, welches sie aufgrund ihrer Begeisterung für die Wissenschaft und ihrer humorvollen Art schufen. Ebenso möchte ich Gunnar-Ingi Kristjansson für seine Hilfe bei der Laborarbeit danken.

Katharina Hubertus, Sabrina Jasper und Michael Ok danke ich für die innige Freundschaft, die sich aus unserer Arbeit am Institut entwickelt hat.

Ganz besonders möchte ich meiner Familie danken, die mich auf meinem Lebensweg fortwährend förderte und unterstützte. Ich danke Euch für euer Verständnis und dass Ihr stets ein Rückzugsort und eine Konstante in meinem Leben seid.

Christian Möller