

Aus dem Institut für Klinische Biochemie und Pathobiochemie

der Universität Würzburg

Vorstand: Professor Dr. med. Ulrich Walter

**Plakophilin-2-Gen und Troponin-I-Gen als Krankheitskandidatengene für die  
arrhythmogene rechtsventrikuläre Kardiomyopathie und die restriktive  
Kardiomyopathie**

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Aurelia Katharina Dettling

aus Tübingen

Würzburg, August 2011

Referent: Prof. Dr. Michael Zimmer, Institut für klinische Biochemie und Pathobiochemie

Korreferent: Prof. Dr. Dr. Phys. Wolfgang Bauer, Medizinische Klinik und Poliklinik I

Dekan: Prof. Dr. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung:

18.Dezember 2012

Die Promovendin ist Ärztin

# Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung .....	1
1.1	Zielsetzung der Arbeit .....	1
1.2	Das menschliche Herz .....	2
1.2.1	Anatomie und Physiologie des Herzens .....	2
1.2.2	Die Herzmuskulatur .....	4
1.2.3	Die Herzmuskelkontraktion .....	7
1.2.4	Plakophilin 2 als Bestandteil der kardialen Desmosomen .....	8
1.2.5	Der kardiale Troponinkomplex .....	11
1.3	Kardiomyopathien .....	13
1.3.1	Definition und Einteilung der Kardiomyopathien .....	13
1.4	Arrhythmogene rechtsventrikuläre Kardiomyopathie .....	16
1.5	Restriktive Kardiomyopathie .....	17
1.6	Pathogene Mutationen .....	18
1.7	Für ARVC verantwortliche Mutationen im Plakophilin 2 .....	21
1.7.1	PKP2-Mutationen .....	22
1.8	Für RCM verantwortliche Mutationen im Troponin .....	25
1.8.1	TNNI-Mutationen .....	25
2	Material und Methoden .....	29
2.1	Chemikalien und Arbeitsmaterial .....	29
2.2	Polymerase-Ketten-Reaktion .....	33
2.2.1	Standardprotokoll für eine PCR-Reaktion .....	37
2.2.2	DNA-Isolation .....	37
2.2.3	RNA-Isolation .....	38
2.2.4	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäurelösungen .....	38
2.2.5	Reverse Transkription .....	39

2.2.6	Agarose-Gelelektrophorese .....	39
2.3	Mutationsanalyse von Kandidatengenomen .....	41
2.4	DNA-Sequenzierung .....	42
3	Ergebnisse .....	44
3.1	Familie A .....	44
3.2	Familie B .....	58
4	Diskussion .....	66
4.1	Sequenzierung des PKP-2-Gens der Familie A .....	66
4.1.1	Untersuchungen an Familie A .....	67
4.2	Sequenzierung des TNNI3-Gens der Familie B .....	70
4.2.1	Untersuchungen an Familie B .....	71
5	Zusammenfassung .....	74
6	Literaturverzeichnis .....	76
7	Abbildungsverzeichnis .....	86
8	Abkürzungsverzeichnis .....	90



# 1 Einleitung

## 1.1 Zielsetzung der Arbeit

Es wurden unter Anwendung molekulargenetischer Methoden zwei Familien (Familie A und B) untersucht, bei denen genetisch bedingte Herzmuskelerkrankungen bekannt waren. Beide Familien waren für eine Kopplungsanalyse nicht groß genug, so dass die krankheitsverursachenden Mutationen durch direkte Sequenzierung von Kandidatengen identifiziert werden sollten. Bei Familie A wurde eine arrhythmogene rechtsventrikuläre Kardiomyopathie diagnostiziert. Es wurden die eineiigen Zwillingenbrüder II-2 und II-3 untersucht. Patient II-2 war klinisch an einer fortgeschrittenen ARVC erkrankt und hatte einen Defibrillator (ICD) implantiert. Sein Zwillingenbruder II-3 besaß noch keine klinischen Symptome, zeigte aber bereits zum Zeitpunkt der Untersuchung in der Echokardiographie Fetteinlagerungen im Myokard und eine eingeschränkte Pumpfunktion des leicht vergrößerten rechten Ventrikels. Bei der ARVC wird in bis zu 80% aller Fälle eine genetische Komponente vermutet. (Gemayel et al. 2001) Sequenzanalysen ergaben, dass mehr als 25% der untersuchten ARVC-Patienten eine heterozygote Mutation im Gen für Plakophilin 2 tragen (Gerull et al. 2004) und somit am häufigsten bei ARVC-Patienten sind, weshalb für Familie A das Plakophilin-2-Gen für die molekulargenetische Untersuchung gewählt wurde.

Die Mitglieder der Familie B waren an der seltenen restriktiven Kardiomyopathie erkrankt. Die Tochter III-1 zeigte bereits im Alter von 19 Monaten Symptome einer restriktiven Kardiomyopathie. Ihre Mutter II-1 wies subjektiv keine Beschwerden auf, die echokardiographische Untersuchung deutete allerdings auf eine eingeschränkte Ventrikelfunktion hin. Der Vater der Patientin II-1 verstarb bereits an den Folgen der restriktiven Kardiomyopathie. Die Tante II-3 mütterlicherseits des kranken Kindes war bisher gesund, genauso wie der Vater II-2. Das gehäufte gemeinsame Auftreten von Symptomen der RCM und der HCM innerhalb derselben Familien lässt vermuten, dass es auch bei der RCM einen pathogenetischen Zusammenhang mit Mutationen in sarkomeren, kontraktilen Proteinen geben muss, wie bei der HCM bereits bekannt. Kopplungsanalysen, um Gene der sarkomeren, kontraktilen Protein zu untersuchen, ergaben das kardiale Troponin I (TNNI3) als wahrscheinlichstes Krankheitsgen. Die

Identifikation von TNNI3 Mutationen bei idiopathischen RCM-Patienten weist darauf hin, dass dieser Phänotyp zum Spektrum der erblichen Erkrankungen sarkomerer kontraktiler Proteine gehört und deshalb wurde in dieser Arbeit das Troponin-I-Gen durch direkte Sequenzierung als Kandidatengen untersucht. (Mogensen et al. 2003)

## **1.2 Das menschliche Herz**

### **1.2.1 Anatomie und Physiologie des Herzens**

Das Herz ist ein Hohlmuskel und gewährleistet als zentrales Kreislauforgan die Versorgung der Organe mit Sauerstoff und Nährstoffen.

Das faustgroße Organ sitzt im Mediastinum zwischen den beiden Lungenflügeln dem Zwerchfell auf, dorsal wird es von Ösophagus und Aorta begrenzt. Das Herzgewicht beträgt bei einem normalgewichtigen, herzgesunden Erwachsenen ca. 300-350g. Das Herz wird von einem bindegewebigen Herzbeutel, dem Perikard umgeben, das mit dem Zwerchfell verwachsen ist. Am Abgang der großen Blutgefäße schlägt das Perikard in das Epikard um, der innersten Schicht des Herzbeutels. Zwischen Perikard und Epikard liegt ein sehr gleitfähiger Spaltraum, der dem Herzen eine möglichst reibungsarme Verschiebung im Herzbeutel ermöglicht. Unter dem Epikard befindet sich das Myokard, die dicke Herzmuskelschicht. Das Endokard kleidet als seröse Haut die Herzbinnenräume aus.

In funktioneller Hinsicht besteht das Herz aus zwei getrennten Pumpsystemen, der rechten und der linken Herzhälfte, sie sind jeweils aus einem dickwandigen Ventrikel und einem dünnwandigen Vorhof (Atrium) aufgebaut. Diese Räume werden durch die Herzscheidewand getrennt. Der Vorhof des rechten Herzens sammelt das, aus der V. cava superior und inferior stammende venöse Blut und leitet es an den rechten Ventrikel weiter. Durch Kontraktion des Ventrikels wird das Blut über die A. pulmonalis in den Lungenkreislauf befördert. Der linke Vorhof erhält das sauerstoffreiche Blut aus dem Lungenkreislauf und gibt es an den linken Ventrikel weiter, dieser pumpt das sauerstoffreiche Blut über die Aorta in den Körperkreislauf. Das Zurückfließen des Blutes bei Kontraktion der Ventrikel wird durch die Herzklappen verhindert, so hindert die Mitralklappe zwischen linkem Vorhof und Ventrikel bzw. die Trikuspidalklappe

zwischen rechtem Vorhof und Ventrikel das Blut am Rückfluss in die Vorhöfe. Die Aortenklappe zwischen linkem Ventrikel und Aorta bzw. die Pulmonalklappe zwischen rechtem Ventrikel und Pulmonalarterie verhindert den Rückstrom in die Kammer.

Die Kontraktion von rechtem und linkem Herzen erfolgt gleichzeitig. Die Pumpfunktion des Herzens entsteht durch die rhythmische Abfolge einer Kontraktionsphase (Systole) und einer Erschlaffungsphase (Diastole). Während dieses Herzzyklus füllen sich zunächst die Vorhöfe, während die Kammern gleichzeitig das Blut in die Arterien auswerfen. Wenn sich die Kammermuskulatur in der Diastole entspannt, öffnet sich die Mitral- bzw. die Trikuspidalklappe und das Blut fließt durch den Druckabfall in den Kammern, aus den Vorhöfen in die Kammern. Dies wird zusätzlich durch die Kontraktion der Vorhöfe unterstützt. Nun kontrahiert sich die Kammermuskulatur isovolumetrisch, der Druck im Ventrikel steigt an, die Klappen zwischen Vorhöfen und Ventrikel schließen sich und das Blut kann durch die geöffnete Aorten- bzw. Pulmonalklappe in die Arterien ausströmen.

Die pro Zeiteinheit geförderte Menge Blut wird als Herzzeitvolumen bezeichnet und setzt sich aus der Herzfrequenz (in Ruhe ca. 60-80 Schläge/min) und dem Schlagvolumen (normalerweise ca. 75ml) zusammen.

Herzmuskelzellen sind autorhythmisch, d.h. sie sind zur Spontandepolarisation fähig und kontrahieren ohne Nervenimpulse. Physiologischerweise breitet sich die Erregung des Herzens vom Sinus-Knoten (im rechten Atrium lokalisierte spezialisierte Herzmuskelzellen) ausgehend fächerförmig über die Vorhöfe aus. Die Vorhöfe sind gegenüber den Ventrikeln durch das sog. Herzskelett isoliert. Nächste Station ist der AV-Knoten, der auf Höhe des Septums zwischen Vorhof und Kammer liegt und die einzige elektrische Verbindung zwischen Vorhöfen und Ventrikeln bildet und hier die elektrische Erregung verzögert. Vom AV-Knoten wird die Erregung über die His-Bündel und Purkinje-Fasern geleitet, bis sie schließlich die gesamte Ventrikelwand erreicht. Die Verzögerung im AV-Knoten gewährleistet, dass die Atrien vollständig kontrahiert sind und das gesamte Blut aus den Atrien entleert ist, bevor sich die Ventrikel kontrahieren.

Das Herz arbeitet zwar autonom, unterliegt aber der Kontrolle des autonomen Nervensystems, um die Herzfunktion den Bedürfnissen des Kreislaufs anzupassen. Der

Sympathikus des autonomen Nervensystems steigert die Erregungsbildung und damit die Herzfrequenz (positiv chronotrop), sowie die Erregungsausbreitung (positiv dromotrop) und das Kontraktionsvermögen (positiv inotrop). Zudem wird die Herzmuskulatur durch die zirkulierenden Katecholamine Adrenalin und Noradrenalin erregt. Das parasympathische System senkt die Herzfrequenz (negativ chronotrop) und die Erregungsleitung (negativ dromotrop). In Ruhe überwiegen die parasympathischen Einfüsse. (Renz-Polster et al. 2004; Silbernagl 2005)

### **1.2.2 Die Herzmuskulatur**

Die Herzmuskulatur ist eine besondere Form der quergestreiften Muskulatur. Im Gegensatz zur Skelettmuskulatur sind die Herzmuskelfasern im Myokard nicht parallel angeordnet, sondern bilden ein verzweigtes, komplexes, dreidimensionales Netzwerk. Kardiale Myocyten besitzen einen großen, zentral gelegenen Zellkern und sind von einer dünnen Membran, dem Sarkolemma umgeben. An ihren Enden sind sie durch spezialisierte Bereiche der Plasmamembran, den stufenförmigen Glanzstreifen (Disci intercalares) verbunden. Innerhalb der Glanzstreifen befinden sich drei verschiedene Zellkontakte: Adhärenskontakte (Fasciae adhaerentes), Gap junctions (Nexus) und Desmosomen. (Fatkin et al. 2002; Welsch 2002)

Adhärenskontakte und Desmosomen sorgen für die Haftung zwischen benachbarten Zellen, sie dienen der festen mechanischen Verbindung der Herzmuskelzellen und können damit die Stabilisierung des Gewebes gegenüber Zug- und Scherkräften gewährleisten. (Welsch 2002)

Adhärensverbindungen befinden sich in den transversalen Anteilen der Glanzstreifen und verankern dort die Aktinfilamente durch submembrane Plaques, die u.a. aus Actinin, Vinculin und Cateninen bestehen. Auch die Desmosomen sind in den transversalen Anteilen der Glanzstreifen lokalisiert und besitzen cytoplasmatische Plaques aus Verankerungsproteinen, diese enthalten hauptsächlich die Proteine Plakoglobin und Desmoplakin. Die Plaques der Desmosomen sind dichter und dienen der Verankerung der Intermediärfilamente, bei denen es sich in Kardiomyocyten um Desminfilamente handelt. Der Kontakt zu benachbarten Zellen wird bei beiden

Interzellularkontakten durch Proteine der Cadherin-Familie vermittelt. Cadherine sind transmembranöse Proteine, deren extrazelluläre Domänen nur in Anwesenheit von Calcium-Ionen interagieren können.

Sowohl für die metabolische, als auch für elektrische Kopplung zwischen den Zellen sind die Gap junctions verantwortlich. Gap junctions bestehen aus sechs Connexin-Untereinheiten, die einen Tunnel, das Connexon mit zentraler Pore bilden. Dieser ca. 2-5nm große Tunnel erlaubt u.a. anorganischen Ionen, Aminosäuren, Vitaminen und elektrischen Impulsen von einer Zelle zur anderen zu gelangen. (Alberts 2002)

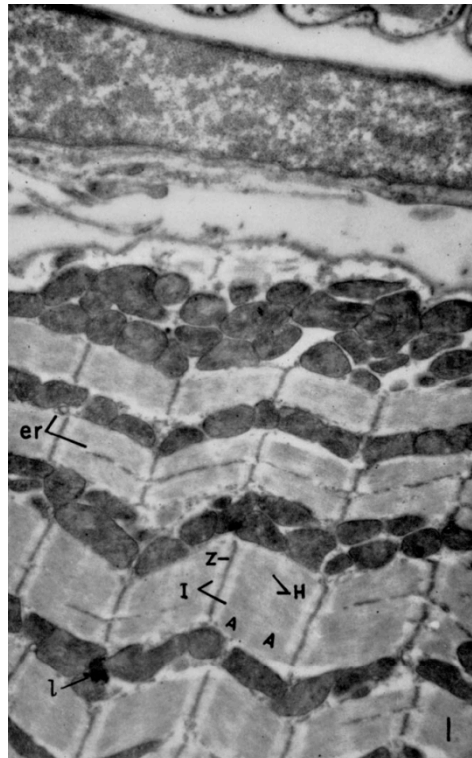
Das Zellinnere der Myocyten enthält Bündel von longitudinal angeordneten Myofibrillen mit charakteristischem Streifenmuster ähnlich der Skelettmuskulatur. Die Myofibrillen sind zylinderförmige Strukturen, bestehend aus mehreren hintereinander geschalteten Sarkomeren. Sarkomere sind die kleinste kontraktile Einheit des Herzmuskels, bestehend aus überlappenden dünnen und dicken Filamenten. Sie reichen von Z- zu Z-Scheibe (oder auch Z-Linie). Z-Scheiben sind dichte Gitterwerke aus verzahnten und interagierenden Proteinen ( $\alpha$ -Aktinin, Filamin, Telethonin, Myotilin, CapZ), welche die Organisation der Myofilamente durch Quervernetzung der Aktin-, Nebulin- und Titinfilamente benachbarter Sarkomere bewahren.

Dünne Filamente bestehen hauptsächlich aus Aktin, welches in der Zelle in zwei Zustandsformen vorhanden ist. Ein Aktinmolekül allein wird als G-Aktin bezeichnet, das als Monomer vorliegt. Mehrere dieser Aktinmonomere polymerisieren zum filamentösen F-Aktin, das eine helikale Struktur aufweist. Die Enden der Aktinfilamente weisen eine funktionelle und strukturelle Polarität auf, so wird das Ende, an dem die ATP-Bindungstaschen der Monomere zugänglich sind, als Minus-Ende bezeichnet, das gegenüber liegende als Plus-Ende. Hier wird die Depolymerisation des Aktins durch CapZ und am Minus-Ende durch Tropomodulin verhindert. An ihrem Plus-Ende sind die Aktinfilamente in einer Z-Scheibe am Ende des Sarkomers verankert. Das Minus-Ende der Aktin-Filamente reicht bis zur Mitte des Sarkomers, wo sie sich mit den dicken Filamenten verzahnen. Die Länge der Aktinfilamente wird durch das lange unelastische Protein Nebulin bestimmt, es umgibt das Aktinfilament spiralförmig und stabilisiert es dadurch.

Die dicken Filamente bestehen aus Myosin und den Myosin-bindenden Proteinen C, H, X. Das spezifische Myosinmolekül im Muskel lässt sich grob in drei Abschnitte unterteilen: Kopf-, Hals- und Schwanzdomäne. Das Myosinköpfchen dient als Bindungsstelle für Aktin und besitzt eine ATPase-Aktivität, der Hals dient als bewegliches Scharnier bei der Interaktion zwischen Aktin und Myosin, mit Hilfe des Schwanzteils können sich mehrere Myosinmoleküle zu Filamenten zusammenlagern. Das Myosinmolekül liegt als Dimer vor und besteht aus sechs Untereinheiten (Polypeptidketten), zwei schweren und vier leichten Ketten. Das Verankerungsprotein Titin stellt eine elastische Verbindung zur nächsten Z-Scheibe her, indem es über Myomesin mit den Myosinfilamenten verbunden ist und sorgt damit für die optimale Position der Filamente bei der Kontraktion.

Die kontraktilen Filamente liegen im nicht kontrahierten Zustand parallel nebeneinander und haben eine unterschiedliche optische Dichte. Jedes Sarkomer ist aus einer A-Bande (sowohl dünne als auch dicke Myofilamente), mit einer zentralen M-Linie (nur dicke Filamente) aufgebaut. Lateral der A-Banden liegen die I-Banden (nur dünne Filamente), begrenzt von Z-Linien.

Das Zytoskelett ist ein komplexes, bewegliches Geflecht, das vom Nucleus ausgeht und bis zur Zellmembran reicht. Es besteht aus Aktinfilamenten, Intermediärfilamenten (hauptsächlich Desmin) und Mikrotubuli und dient der Stabilisierung der intrazellulären Strukturen, verankert die Zellen in der extrazellulären Matrix und überträgt mechanische Kräfte auf benachbarte Zellen. (Alberts 2002; Fatkin et al. 2002)



**Abb. 1** aus (Moore et al. 1957) Elektronenmikroskopische Aufnahme einer ventrikulären Herzmuskelzelle im Längsschnitt. I = I-Bande (nur dünne Filamente), A = A-Bande (dicke und dünne Filamente), H = H-Bande, Z = Z-Bande, er = endoplasmatisches Retikulum, l = Lipidkörperchen

### 1.2.3 Die Herzmuskelkontraktion

Der Herzmuskel ist der am schwersten arbeitende Muskel des menschlichen Körpers. Er kontrahiert sich ca. drei Billionen mal während eines Menschenlebens (Alberts 2002)

Die Kontraktion beruht auf einer Wechselwirkung zwischen Aktin und Myosin und wird durch die Gleitfilamenttheorie (Huxley 1954) beschrieben. Zu Beginn des Kontraktionsvorgangs ist der Myosinkopf fest an Aktin gebunden, es liegt Aktomyosin vor. Durch die Bindung von ATP am Myosinkopf kommt es zu einer Konformationsänderung, wodurch die Affinität des Myosins zum Aktin stark abnimmt und sich Myosin und Aktin trennen. Durch die anschließende  $Mg^{2+}$ -abhängige Hydrolyse von ATP zu ADP und anorganischem Phosphat  $P_i$  durch die ATPase-Aktivität des Myosins erfolgt eine erneute schwache Bindung zwischen Aktin und

Myosin. Die folgende Freisetzung von ADP und Pi erzeugt den eigentlichen Kraftschlag, bei dem der Myosinkopf abknickt und am Aktinfilament entlang gleitet. (Fatkin et al. 2002; Silbernagl 2005)

Während des kardialen Aktionspotentials kommt es zu einem raschen transmembranösen Calcium-Einstrom über spannungsabhängige L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle. Die intrazellulär steigende  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration führt zu einer weiteren Freisetzung von  $\text{Ca}^{2+}$  aus dem sarkoplasmatischen Reticulum über Ryanodin- und Inositoltriphosphat-Rezeptoren. Der Anstieg der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration wird durch Proteine registriert, die mit den Aktinfilamenten interagieren wie der Troponinkomplex und das Tropomyosin. Durch ihre Interaktion zwischen Aktin und Myosin können sich die Sarkomere kontrahieren. s. Abschnitt 1.2.5 (Fatkin et al. 2002) Mit Hilfe einer SR- $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase und eines membranösen  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauschers wird die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration wieder auf das Ruhenniveau gesenkt und die intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher wieder gefüllt. (Gordon et al. 2001)

#### **1.2.4 Plakophilin 2 als Bestandteil der kardialen Desmosomen**

Für die Aufrechterhaltung der strukturellen und funktionellen Stabilität des Herzmuskelgewebes sind Zellverbindungen von essentieller Bedeutung. Im Zellverband der Myocyten sichern Desmosomen, Adhärenzverbindungen und Gap junctions in den Glanzstreifen die Integrität des Gewebes, indem sie filament-verankernde Verbindungen bilden, welche die mechanische Integrität des Zellverbandes entscheidend bestimmen. (Perriard et al. 2003)

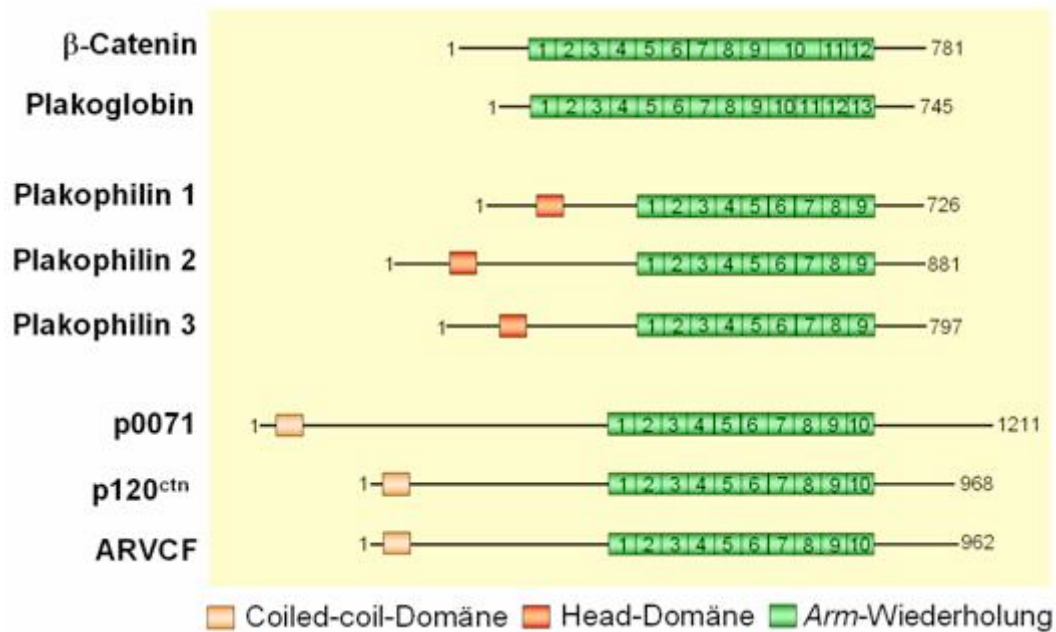
Plakophiline gehören zur Familie der Armadillo-Proteine. Diese Proteine haben entscheidende strukturelle und regulatorische Aufgaben bei der Interaktion von Proteinen in Desmosomen und Adhärenzverbindungen. Am besten beschrieben sind die desmosomalen Interaktionen der Armadillo-Proteine, an denen Plakoglobin beteiligt ist. (Mertens et al. 1996) Die Armadillo-Familie der Adhäsionsmoleküle charakterisiert sich durch aneinander gereihete Armadillo (Arm) -Motive, welche eine Länge von ungefähr 42 Aminosäuren aufweisen. Sie wurden erstmals im *armadillo*-Gen von *Drosophila melanogaster* nachgewiesen. (Peifer et al. 1990) Zur Familie der Armadillo-Proteine



gehören neben den Plakophilinen auch  $\beta$ -Catenin, Plakoglobin und die p120Catenine. (Franke et al. 1989; Reynolds et al. 1992)

Die Plakophilin-Unterfamilie der Armadillo-Familie hat drei Mitglieder, Plakophilin 1 (PKP1), Plakophilin 2 (PKP2) und Plakophilin 3 (PKP3). PKP1-3 sind juxtamembranöse Bestandteile der desmosomalen Plaques und sichern dort die Zell-Zell-Bindung, indem sie mit anderen Arm-Proteinen, Desmoplakin und Cadherinen assoziiert sind und sich an der Verankerung der Intermediärfilamente beteiligen. (Bonne et al. 1999; Chen et al. 2002; Hatzfeld et al. 2000; Hatzfeld et al. 1996; Mertens et al. 1999; Mertens et al. 1996) Bei PKP 1 und PKP 2 sind zwei Spleiß-Varianten bekannt, eine kürzere „a“ Form und eine längere „b“ Form. (Hatzfeld et al. 1999; Mertens et al. 1996; Bonne et al. 1999) Plakophilin 2 ist zudem in Assoziation mit dem RNA-Polymerase-III-Komplex beschrieben worden, sowie als Substrat der Tyrosinkinase Tak-1. (Muller et al. 2003; Mertens et al. 2001) Die Rolle der Plakophiline in der Signaltransduktion bleibt jedoch weiterhin offen.

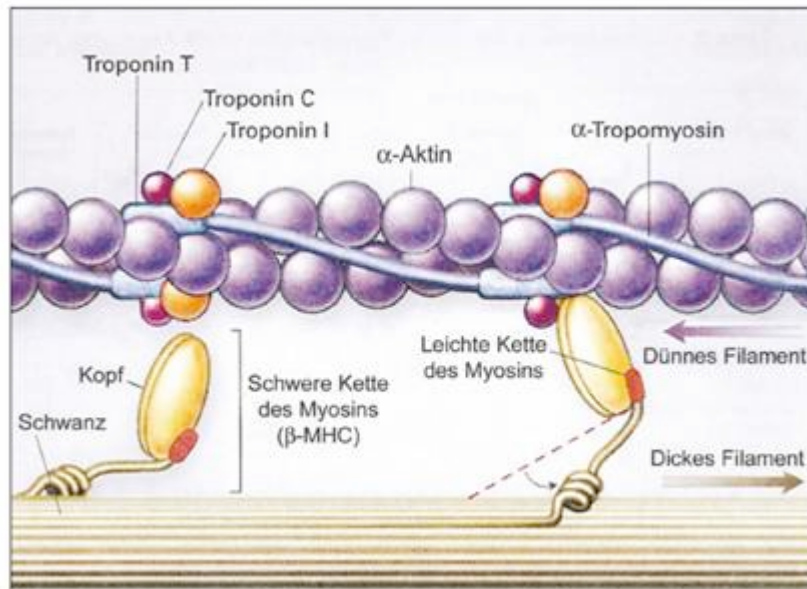
Alle Plakophiline bestehen aus einer N-terminalen Kopf-Domäne, gefolgt von ca. 42 Aminosäure-Wiederholungen, den *arm-repeats* und einem C-terminalen Schwanzteil. Die N-terminale Kopfdomäne zeigt verhältnismäßig mehr Sequenzvarianten als die Arm-Wiederholungen. Eine übereinstimmende Sequenz, HR2 genannt, besitzen alle Plakophiline gemeinsam in der Kopfdomäne. PKP1 kommt in den Desmosomen in oberen Schichten komplexer Epithelien vor. PKP 2 ist am weitesten im Gewebe verbreitet. Es findet sich in den Desmosomen aller Epithelien, komplexen, stratifizierten und einfachen. Auch in nicht-epitheliale Gewebe wie Kardiomyocyten oder in den Follikeln der Lymphknoten konnte PKP 2 nachgewiesen werden. (Chen et al. 2002). Neben ihrer Anwesenheit an der Zellmembran und der damit verbundenen Funktion als adhäsive und stabilisierende Moleküle wurden Plakophiline auch im Zellkern beschrieben. (Mertens et al. 1996) Für einen Großteil dieser Proteine ist die Funktion im Zellkern, zum Beispiel als Signalmolekül noch weitgehend ungeklärt.



**Abb. 2 Die Familie der Armadillo-Proteine sind Adhäsions- und Signalmoleküle.** Diese Proteinfamilie besteht aus drei Unterfamilien. Zur Unterfamilie der klassischen Catenine gehören β-Catenin und Plakoglobin. Die Plakophiline 1-3 bilden eine zweite Unterfamilie und besitzen neben neun Arm-Wiederholungen eine konservierte Sequenz im N-Terminus (Head-Domäne). Die p120-varianten Proteine bilden die dritte Unterfamilie mit p0071, p120catenin und ARVCF, sie haben zusätzlich zu zehn (Arm)adillo-Wiederholungen eine Coiled-coil-Domäne in ihrem N-Terminus. Abb. entnommen aus (Grossmann et al. 2005).

In den kardialen Desmosomen werden die Desminintermediärfilamente durch Plakoglobin, Plakophilin 2 und Desmoplakin mit den desmosomalen Cadherinen verankert. Desmosomale Cadherine, die weiter unterteilt werden in Desmoglein und Desmocollin, sind transmembranöse Proteine, die mit ihrem extrazellulären Anteil ein reißverschlussähnliches Dimer mit dem entsprechenden Anteil der desmosomalen Cadherine des benachbarten Myocyten bilden. (Chen et al. 2002; Mertens et al. 1996) Der intrazelluläre Anteil der Cadherine, Desmoglein und Desmocollin interagiert mit Plakophilin und Plakoglobin, diese binden an das C-terminale Ende der Cadherine, außerdem binden die Armadillo-Proteine an das N-terminale Ende von Desmoplakin. Plakoglobin ist das einzige desmosomale Protein, welches auch in Adhärenzverbindungen nachgewiesen werden konnte. (Zhurinsky et al. 2000; Thiene et al. 2007)

### 1.2.5 Der kardiale Troponinkomplex



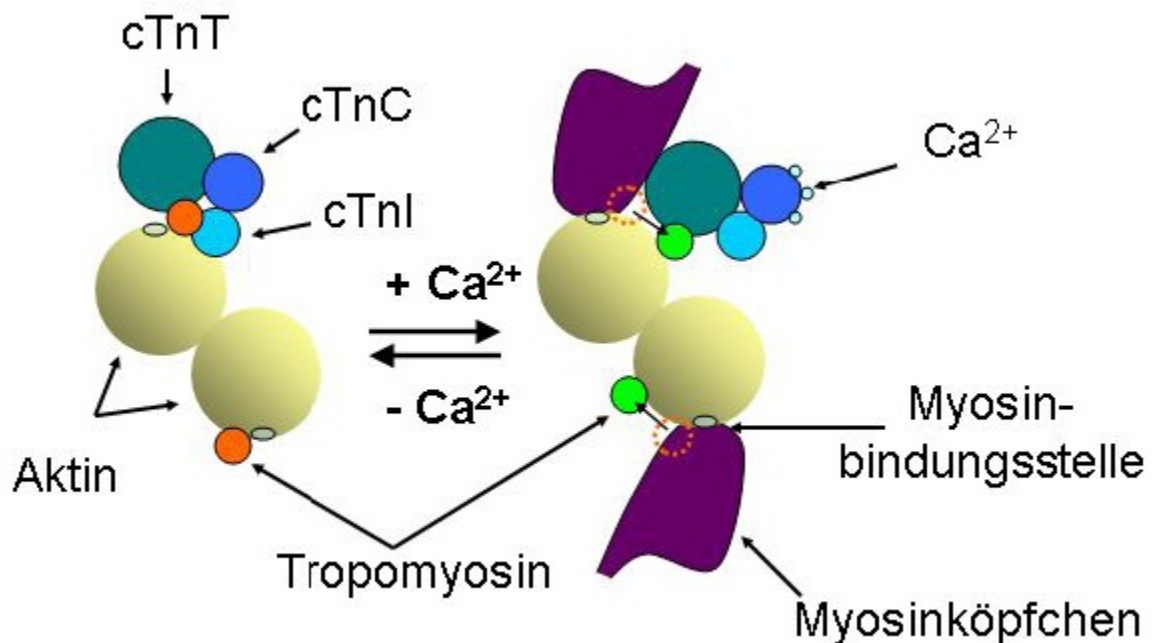
**Abb. 3** Das dünne Filament besteht aus  $\alpha$ -Aktin, dem Troponin-Komplex (Troponin T, I und C) und  $\alpha$ -Tropomyosin.  $\beta$ -MHC und die leichten Ketten des Myosins bilden das dicke Filament. Die Bindung des Myosinkopfes an  $\alpha$ -Aktin führt zur Konformationsänderung des Myosinmoleküls. Dadurch knickt der Kopf gelenkartig ab, zieht  $\alpha$ -Aktin mit sich, und die Filamente gleiten aneinander vorbei. Dies führt zur Verkürzung des Sarkomers. Entnommen aus (Seidman et al. 2001)

Der kardiale Troponinkomplex bildet zusammen mit Aktin und alpha-Tropomyosin die dünnen Filamente der Herzmuskelzelle und reguliert die  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Kontraktion der Kardiomyocyten. Der Troponinkomplex besteht aus drei Untereinheiten, dem Troponin I (TnI), das in Abwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$  die Aktivität der Aktomyosin- $\text{Mg}^{2+}$ -ATPase inhibiert, dem Troponin C (TnC), welches  $\text{Ca}^{2+}$  bindet und die Hemmung durch TnI aufhebt und dem Troponin T (TnT), das den Troponinkomplex am Aktinfilament verankert. (da Silva et al. 1991; Grabarek et al. 1992; Ohtsuki et al. 1986; Zot et al. 1987) Bisher liegt noch keine komplette Kristallstruktur des Troponinkomplexes vor. 2003 wurde die Kristallstruktur der zentralen Domänen des kardialen Troponinkomplexes veröffentlicht. (Takeda et al. 2003)

Im Ruhezustand des Herzmuskels ist Tropomyosin an der Außenseite des Aktinfilaments lokalisiert, die Myosinbindungsstelle auf dem Aktin wird dadurch blockiert. Alpha-Tropomyosin ist ein Dimer aus zwei identischen alpha-helikalen Ketten, die sich auf der gesamten Länge um das Aktinfilament winden und dieses dadurch stabilisieren. (Huang et al. 2004) Die Erhöhung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration beeinflusst die Position des Tropomyosins auf dem Aktinfilament und das Tropomyosin kann eine bevorzugte Position in der Furche des Aktinfilamentes einnehmen. Durch diesen Prozess wird die Bindungsstelle am Aktin für die Myosinbindung frei und die Kontraktion kann stattfinden. (Luo et al. 2002; Gordon et al. 2001)

Im entspannten Zustand der Herzmuskelzelle in Abwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$  sind die  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -Stellen in der COOH-Domäne von TnC von  $\text{Mg}^{2+}$  besetzt, während die  $\text{Ca}^{2+}$ -spezifischen Stellen in der  $\text{NH}_2$ -terminalen Domäne von TnC frei sind. In diesem Fall ist die  $\text{NH}_2$ -terminale Region von TnI an die COOH-terminale Region von TnC, sowie an die COOH-terminale Domäne von TnT gebunden. Außerdem blockiert die inhibitorische und COOH-terminale Domäne des TnI die Position von Aktin und Tropomyosin so, dass eine Interaktion zwischen Aktin und Myosin verhindert wird. (Farah et al. 1995)

Wenn nun  $\text{Ca}^{2+}$  aus dem sarkoplasmatischen Reticulum freigesetzt wird, bindet es an die  $\text{Ca}^{2+}$ -spezifische  $\text{NH}_2$ -terminale Domäne des TnC und erhöht die Affinität dieser Domäne zur inhibitorischen und COOH-terminalen Region des TnI, so dass sich TnI von Aktin und Tropomyosin löst. Das erlaubt wiederum Tropomyosin die bevorzugte Position in der Furche des Aktinfilaments einzunehmen, die Bindungsstelle für Myosin wird freigegeben und die Filamente können aneinander vorbei gleiten. (Farah et al. 1995)



**Abb. 4** Aktivierung der Aktomyosin Interaktion im dünnen Filament durch  $\text{Ca}^{2+}$ : Bei  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindung an cTnC erfährt der cTn-Komplex eine Reihe von Konformationsänderungen, die darin resultieren, dass cTnI nicht länger die Tm-Position an der Außenseite des Aktinfilaments stabilisiert, sondern Tm nun eine Position weiter in der Furche des Aktinfilamentes einnehmen kann und die Myosinbindestelle für die Myosinbindung an Aktin frei wird. cTn, kardiales Troponin; Tm, Tropomyosin .Abb. entnommen aus (Boom et al. 2003).

## 1.3 Kardiomyopathien

### 1.3.1 Definition und Einteilung der Kardiomyopathien

Definition der Kardiomyopathien der AHA:

„Kardiomyopathien sind eine heterogene Gruppe von Krankheiten des Herzmuskels, die mit mechanischen und/oder elektrischen Funktionsstörungen einhergehen und üblicherweise (aber nicht zwingend) eine unangemessene Hypertrophie oder Dilatation der Herzkammern verursachen. Ihre Ursachen sind vielfältig und häufig genetisch bedingt. Kardiomyopathien begrenzen sich entweder auf das Herz oder sind Teil einer allgemeinen Systemerkrankung, führen oft zu kardiovaskulär bedingten Todesfällen oder einer fortschreitenden Behinderung durch Herzversagen.“

Als Kardiomyopathien (CM) werden Erkrankungen des Herzmuskels bezeichnet, die mit einer kardialen Funktionsstörung einhergehen. Es werden zwei Hauptgruppen unterschieden: primäre Kardiomyopathien, die ausschließlich den Herzmuskel betreffen und relativ selten vorkommen und sekundäre Kardiomyopathien, bei denen der Herzmuskel im Rahmen einer systemischen Erkrankung betroffen ist.

Primäre Kardiomyopathien können je nach Ätiologie erworben, familiär/ genetisch bedingt oder beides sein. Sekundäre CM treten in Folge definierter kardialer oder extrakardialer Erkrankungen auf, z.B. bei ischämischen oder valvulären Erkrankungen des Herzens oder als Folge von Herzmuskelentzündungen.

Nach morphologisch-funktionellen Gesichtspunkten erfolgt die Einteilung sowohl primärer, als auch sekundärer Kardiomyopathien in vier Kategorien: Dilatative Kardiomyopathie (DCM), hypertrophe Kardiomyopathie (HCM), arrhythmogene rechtsventrikuläre Kardiomyopathie (ARVC) und restriktive Kardiomyopathie (RCM).

In den letzten Jahrzehnten wurde die Wichtigkeit der Bedeutung der genetischen Defekte für die Ätiologie der primären Kardiomyopathien deutlich. Bisher wurden autosomal-dominante, autosomal-rezessive, X-chromosomale und maternale Vererbungsmuster beobachtet. Familien mit genetisch bedingten Kardiomyopathien stellen eine bedeutende Quelle für genetische Studien dar. (Huang et al. 2004)

Im Folgenden werden die dilatative CM und die hypertrophe CM kurz beschrieben, auf die ARVC und die RCM wird in Abschnitt 1.4 und 1.5 näher eingegangen.

Die dilatative Kardiomyopathie ist die häufigste morphologische Form der Kardiomyopathien mit einer geschätzten Prävalenz von 1:2500. Sie ist die dritt häufigste Ursache für Herzinsuffizienz und der häufigste Grund für Herztransplantationen. (Maron et al. 2006)

Sie ist charakterisiert durch eine Dilatation des linken oder beider Ventrikel (Kardiomegalie), eine reduzierte Wanddicke und eine verminderte systolische Funktion (verminderte Ejektionsfraktion). Die Histopathologie der DCM ist nicht spezifisch (hypertrophe Kardiomyocyten, interstitielle Fibrose, oft massiver Myocytenverlust, Ansammlung von Makrophagen und T-Lymphozyten).

Die häufigste Erstmanifestation ist eine langsam zunehmende Herzinsuffizienz, die eine Transplantation indiziert oder einen plötzlichen Herztod zur Folge haben kann. Herzrhythmusstörungen und thromboembolische Verschlüsse gehören zu den typischen Komplikationen.

Eine DCM kann idiopathisch, familiär-genetisch, viral-entzündlich und/oder immunologisch bedingt sein oder im Zusammenhang mit (alkohol-)toxischen Einflüssen oder mit anderen kardialen Erkrankung auftreten. Im Falle des Vorhandenseins einer anderen kardialen Erkrankung, kann nur von einer CM gesprochen werden, wenn das Ausmaß der myokardialen Dysfunktion nicht ausreichend durch hämodynamische Faktoren (z.B. erhöhte Volumenbelastung bei Klappenfehlern) oder ischämisch bedingte Myokardschäden (z.B. bei KHK) erklärt werden kann. (Richardson et al. 1996)

Bei 20-35% der Fälle tritt die DCM familiär auf. Bislang wurden >20 Loci und Gene identifiziert, die muskuläre Proteine mit ganz unterschiedlichen Funktionen und Aufgabe betreffen, so z.B. Aktin, Desmin, Desmoplakin, Dystrophin, Lamin A/C, Tropomyosin, kardiales Troponin T/I. Die Vererbungsmodi sind hauptsächlich autosomal dominant, können aber auch autosomal rezessiv, X-chromosomal gekoppelt oder mitochondrial vererbt sein.

Die hypertrophe Kardiomyopathie ist die zweithäufigste morphologische Form der Kardiomyopathien. Ihre Prävalenz beträgt ca. 200/100000 und ist die häufigste Ursache für den plötzlichen Herztod junger Erwachsener. (Maron et al. 2006)

Die HCM ist durch eine asymmetrische Größenzunahme des linken und/oder rechten Ventrikels vor allem im Bereich des Septums gekennzeichnet, was zu diastolischen Funktionsstörungen führt. Je nach Lokalisation der Hypertrophie unterscheidet man eine nicht-obstruktive und eine obstruktive HCM mit Behinderung der linksventrikulären Ausflussbahn. (Renz-Polster 2004)

Im histologischen Bild finden sich hypertrophierte Myocyten, ungeordnete Myofibrillen und eine Beeinträchtigung des myokardialen Zellverbandes. Durch die diastolische Funktionsstörung kommt es zu Symptomen der Herzinsuffizienz und frühem plötzlichen Herztod (PHT).

Bei ca. 50% der Patienten handelt es sich um eine familiäre Erkrankung mit autosomal dominantem Vererbungsmodus. Mehr als 10 Genloci wurden bislang als krankheitsverursachend identifiziert, die meist für Proteine des Sarkomers codieren, z.B. alpha/beta-myosin-Schwerkette (MYH7), Myosin-bindendes Protein C, (MYBPC3), Troponin T/I, Myosin-Leichtkette, Titin, alpha-Tropomyosin, alpha-Aktin. (Herold 2008)

#### **1.4 Arrhythmogene rechtsventrikuläre Kardiomyopathie**

Die arrhythmogene rechtsventrikuläre Kardiomyopathie, früher auch arrhythmogene rechtsventrikuläre Dysplasie genannt, ist eine seltene Erkrankung des Herzmuskels mit einer geschätzten Prävalenz von 1:2000 bis 1:5000. (Corrado et al. 2009; Maron et al. 2006) Die genaue Prävalenz ist unbekannt. Aufgrund der zahlreichen nicht- oder falschdiagnostizierten Fälle könnte die Prävalenz sogar noch höher als der geschätzte Wert sein. (Thiene et al. 2007) 10-20% aller plötzlichen Herztodesfälle junger Männer sind Folge einer ARVC. (Herold 2008) Charakteristisch für die ARVC ist der Verlust von Myocyten durch Nekrose und Apoptose und die fibrolipomatöse Umwandlung des Gewebes des rechten Ventrikels. (Fatkin et al. 2002) Die daraus resultierende Störung des kardialen Zellverbandes führt zur Erweiterung des rechten Ventrikels, was zu Funktionsstörungen, lebensbedrohlichen Herzrhythmusstörungen und plötzlichem Herztod führen kann. (Awad et al. 2008) Die ARVC manifestiert sich meist um das 30. Lebensjahr und kann dann als erste Symptome Kammerflimmern und/oder Synkopen zeigen, im weiteren Verlauf kann es zu Kammertachykardien und plötzlichem Herztod kommen. Versterben die Patienten nicht am plötzlichen Herztod, kann der weitere Krankheitsverlauf zu schwerer Herzinsuffizienz führen. (Herold 2008; Thiene et al. 2007)

In 30-50% der Fälle (Corrado et al. 2009) tritt die ARVC familiär gehäuft auf und geht mit einer autosomal dominanten Vererbung mit inkompletter Penetranz und hoher Variabilität einher. 50% der symptomatischen Patienten besitzen eine Mutation in verschiedenen Bestandteilen der kardialen Desmosomen. (Awad et al. 2008) Bisher wurden 9 Genmutationen nachgewiesen, davon am häufigsten im Plakophilin-2-Gen



(PKP2), außerdem u.a. Mutationen von Desmoplakin, Plakoglobin (Naxos disease) und dem Ryanodin-2-Rezeptor (RYR2). (Herold 2008)

Die klinische Diagnose ARVC ist aufgrund ihrer unspezifischen Symptomatik, dem breiten Spektrum phänotypischer Manifestationen und der Spannweite von asymptomatischen bis hin zu schwersten Formen oft schwierig zu stellen. (Corrado et al. 2009)

Im EKG kann in 10% der Fälle eine Epsilon-Welle am Ende des verbreiterten QRS-Komplexes nachgewiesen werden, evtl. zeigt sich eine T-Negativierung oder ein Rechtsschenkelblock. Echokardiographisch lassen sich lokale Bewegungsstörungen und Hypokinesie sowie eine Dilatation des rechten Ventrikels darstellen. Die Fettgewebseinlagerungen können im MRT beurteilt werden. Zur weiteren Diagnostik kann auch eine Myokardbiopsie entnommen werden, um die Vermehrung intramyokardialer Fettzellen (Fibrolipomatose) nachzuweisen.

Die Therapie der arrhythmogenen rechtsventrikulären Kardiomyopathie erfolgt nur symptomatisch, d.h. körperliche Schonung, Behandlung und Prophylaxe der Arrhythmien mit z.B. Betablockern und/oder Implantation eines ICD (implantierbarer Cardioconverter). Die 10-Jahres-Letalität beträgt ohne Therapie ca. 30%. (Herold 2008)

## **1.5 Restriktive Kardiomyopathie**

Die restriktive Kardiomyopathie ist ebenfalls eine sehr seltene Form der Herzmuskelerkrankungen (< 5%) Bisher konnten keine epidemiologischen Zahlen erhoben werden.

Die RCM ist durch eine Verminderung der diastolischen Dehnbarkeit charakterisiert. Daraus resultiert eine eingeschränkte ventrikuläre Füllung eines oder beider Ventrikel in der Diastole bei normaler oder beinahe normaler systolischer Ventrikelfunktion (DD: DCM). Das Herz zeigt normale oder nur gering verdickte Ventrikelwände (DD: HCM). Histologisch kann sich eine interstitielle Fibrosierung zeigen.

Symptomatisch wird die RCM durch Zeichen einer progressiven Herzinsuffizienz. In fortgeschrittenen Stadien ist das Endokard verdickt und mit Thromben belegt. Es kommt zu zunehmenden diastolischen Ventrikelfunktionsstörungen und zur

Entwicklung einer therapieresistenten Rechtsherzinsuffizienz mit Einflusstauung vor dem rechten Herzen.

Vor allem bei Krankheitsbeginn in der Kindheit hat die RCM eine schlechte Prognose und die Patienten benötigen häufig eine Herztransplantation oder versterben frühzeitig am plötzlichen Herztod.

Die RCM kann verschiedene Ursachen haben. Sie kann im Rahmen systemischer Erkrankungen als sekundäre RCM auftreten, wie z.B. als infiltrative RCM bei Amyloidose oder Sarkoidose, im Zusammenhang einer Speichererkrankung wie M. Fabry oder Hämochromatose, oder als endomyokardiale Form bei Hypereosinophilie (Löffler-Endokarditis) und beim Hedinger-Syndrom (Endomyokardfibrose) des Karzinoids.

Des Weiteren können für eine RCM auch genetische Faktoren verantwortlich sein (primäre CM). Bisher wurden 6 Mutationen bei Patienten mit idiopathischer RCM im Troponin-I-Gen entdeckt. s. Abschnitt 1.8.1

Obwohl verschiedene vererbte oder erworbene Funktionsstörungen eine RCM verursachen können, bleiben doch einige Fälle idiopathisch. Bildgebende diagnostische Mittel sind die Echokardiographie mit Dopplerfunktion, bei der das Herz vergrößerte Vorhöfe bei normal großen Ventrikeln und nahezu normaler systolischer Kontraktion zeigt, Röntgen, CT oder MRT. Die invasive Diagnostik erfolgt mittels simultaner RV-/LV-Druckmessung oder einer Biopsie des Herzmuskelgewebes.

Zum therapeutischen Vorgehen bei sekundär bedingter RCM gehört die Behandlung der Grunderkrankung. Die Herzinsuffizienz wird frühzeitig mit Diuretika behandelt. Wichtig sind außerdem die Kontrolle der Herzfrequenz mit dem Ziel einer langen Diastole und eine Thromboembolieprophylaxe. Bei fortgeschrittener Herzinsuffizienz ist bei vielen Patienten eine Herztransplantation nötig. (Mogensen et al. 2003)

## **1.6 Pathogene Mutationen**

Mutationen lassen sich einteilen in Mutationen, die ein einzelnes Gen betreffen *Genmutationen*, in Mutationen, die Chromosomenabschnitte verändern

*Strukturmutationen* und in Mutationen, die zu einer Änderung der Chromosomenzahl führen *Chromosomenmutationen*.

Mutationen können durch mutagene Umweltfaktoren, wie Toxine oder UV-Strahlen entstehen, endogen durch Fehler der DNA-Reparatur/ -Replikation, während der Zellteilung oder durch Transpositionen.

Zu den Genmutationen, bei denen sich die codierende Sequenz eines Gens verändert, gehört die *Substitution*, bei der eine Base durch eine andere ersetzt wird, die *Transition*, bei der Purine gegen Purine oder Pyrimidine gegen Pyrimidine ausgetauscht werden, bei der *Transversion* hingegen Purine gegen Pyrimidine und umgekehrt. Als *Insertion* bezeichnet man die Einfügung, als *Deletion* den Verlust einer oder mehrerer Basen.

Strukturmutationen entstehen durch Translokation, bei der Segmente eines Chromosoms auf ein anderes nicht homologes Chromosom übertragen werden oder durch Veränderungen der Genreihenfolge auf einem Chromosom als Folge ungleicher Rekombinationsereignisse (Inversion, Deletion, Duplikation). Strukturveränderungen der Chromosomen führen zu einer Störung der Genbalance, was die Expressionsrate der Proteine verändert und die Entstehung letaler Genotypen begünstigt.

Unter Aneuploidie versteht man die Änderung der Chromosomenzahl, während der Mitose kommt es zu einer Fehlverteilung der Chromosomen, dabei erhält eine Tochterzelle beide homologen Chromosomen und die andere keines, was ebenfalls zur Störung der Genbalance führt.

Verschiedene Mutationen wirken sich unterschiedlich auf die Funktion des Proteins aus. Nonsense-Mutationen, bei denen eine Punktmutation ein Codon in ein Stopcodon umwandelt, führen zum vorzeitigen Abbruch der Polypeptidkette und gewöhnlich zu einem nicht funktionsfähigen Protein und haben erhebliche phänotypische Auswirkungen. Es können Proteine produziert werden, die am C-terminalen Ende verkürzt sind oder das Einfügen eines Stopcodons bewirkt eine Instabilität der mRNA, was zu einem schnellen Abbau der mRNA schon vor der Translation führt. Weil der genetische Code redundant ist, müssen Substitutionen nicht den Einbau einer anderen, „falschen“ Aminosäure bewirken. Wenn, wie bei einer Missense-Mutation, eine unkorrekte Aminosäure verwendet wird, beeinflusst das die Proteinfunktion nicht unbedingt, es sei denn sie befindet sich in einem wichtigen Abschnitt des Proteins, wie

z.B. im katalytischen Zentrum des Proteins oder sie führt zum Austausch einer Aminosäure gegen eine andere mit unterschiedlichen chemischen Eigenschaften. Eine Änderung der Polarität oder elektrischen Ladung beeinflusst die Faltung und damit auch die Aktivität des Proteins. Deletionen und Insertionen haben sehr drastische Auswirkungen auf die Proteinstruktur, denn sie bringen die Tripletfolge durcheinander, in der die Basen gelesen werden.

Mutationen in nichtcodierenden Sequenzen, die aber pathogene Konsequenzen haben, betreffen wichtige Intronen oder untranslatierte Abschnitte, die aber für eine korrekte Regulation der Transkription oder Translation des Proteins essentiell sind. Fehlerhafte Spleißmuster können zum Ausschluss ganzer Exonsequenzen oder zu Translation von Intronsequenzen führen, wodurch in den meisten Fällen das Leseraster verschoben und das Protein funktionsunfähig wird.

Es hängt von einer Reihe verschiedener Faktoren ab, ob sich und wie sehr sich eine pathogene Mutation im Phänotyp manifestiert. Mutationen, die nur eines der beiden Allele betreffen, können durch gesteigerte Expression des gesunden Allels ausgeglichen werden oder es bildet sich im Vergleich zu einem homozygoten Träger der Mutation ein schwächerer Phänotyp aus. Dies kann folgendermaßen erklärt werden: zum einen kann die Funktionsfähigkeit des normalen Allels behindert werden, sog. dominant-negativer Effekt und zum anderen kann die Proteinmenge des normalen Allels nicht ausreichend sein, sog. Haploinsuffizienz. Außerdem haben auch der Ort und der Zeitpunkt der Mutationsentstehung Einfluss auf den Phänotypen. Mutationen, die über die Keimbahn vererbt werden oder früh in die Embryonalentwicklung exprimierte Gene betreffen, haben einen größeren Einfluss auf den Phänotyp gegenüber Mutationen, die spät in der Entwicklung nur in einzelnen somatischen Zellen auftreten. (Lehrman et al. 1987; Baserga et al. 1992)

## **1.7 Für ARVC verantwortliche Mutationen im Plakophilin 2**

In ca. 50% der Fälle ist die ARVC familiär vererbt. Die typische Form der ARVC ist ein autosomal-dominanter Erbgang mit unterschiedlicher Penetranz. Es wurden aber auch rezessive Erbgänge identifiziert. (Nava et al. 1988) In den 90er Jahren wurden einige Genloci auf verschiedenen Chromosomen lokalisiert, der erste von Rampazzo et al. auf Chromosom 14q23. (Rampazzo et al. 1994) Die Kandidatengene wurden zuerst bei den Genen gesucht, die für Proteine des Zytoskeletts oder für sarkomere Proteine codieren, doch es stellte sich heraus, dass es sich bei der ARVC weder um eine Erkrankung des Zytoskeletts, wie bei der DCM, noch eine Erkrankung des Sarkomers, wie bei der HCM handelt.

Die erste Mutation, die in Zusammenhang mit der rezessiven ARVC gebracht wurde, ist eine Deletions-Mutation im Plakoglobin-Gen JUP mit autosomal-rezessivem Erbgang (McKoy et al. 2000), die bei Familien auf der ägäischen Insel Naxos entdeckt wurde (Naxos disease). (Protonotarios et al. 2001) Eine 2bp Deletion des Plakoglobins führt zum Abbruch des C-terminalen Endes des Proteins und verursacht die Naxos-Krankheit (Basso et al. 1996), ein kardiocutanes Syndrom, das durch palmoplantare Keratolyse, Wollhaar und ARVC charakterisiert ist.

Als zweites desmosomales Protein wurde Desmoplakin DSP in Zusammenhang mit der familiären ARVC gebracht, ebenfalls ein autosomal-rezessiver Erbgang. Die Symptome ähneln der Naxos-Krankheit, sog. Cavajal-Syndrom. (Norgett et al. 2000; McKoy et al. 2000) Die Entdeckung von Mutationen in zwei funktionell ähnlichen Genen wie JUP und DSP lenkte die Aufmerksamkeit auf weitere desmosomale Proteine für die Aufklärung der ARVC-Pathogenese.

So wurden auch Defekte auf Genen, die für weitere Zelladhäsionsproteine codieren bei der dominanten Variante der Erkrankung entdeckt: Plakophilin-2-Gen PKP2 (Gerull et al. 2004), Desmoglein-2-Gen DSG2 (Pilichou et al. 2006), Desmocollin-2-Gen DSC2. (Syrris et al. 2006)

Andere Erscheinungsformen der ARVC können durch nicht-desmosomale Genmutationen im Ryanodin-Rezeptor-2 RYR2 und im Wachstumsfaktor  $\beta 3$  TGF $\beta 3$  verursacht werden. (Beffagna et al. 2007)

Abkürzung	Krankheitsgen	Chromosomaler Locus	Vererbungsmodus	Autor, Jahr
JUP	Plakoglobin	17q21	AR	McKoy et al., 2000
RYR2	Kardialer Ryanodin-Rezeptor	1q42-q43	AD	Tiso et al., 2001
DSP	Desmoplakin	6p24	AD	Rampazzo et al., 2002
PKP2	Plakophilin 2	12p11	AD	Gerull et al., 2004
TGFβ3	Transforming Growth Factor	14q23-q24	AD	Beffagna et al., 2004
DSG2	Desmoglein	18q12.1	AD	Pilichou et al., 2006
DSC2	Desmocollin 2	18q12.1	AD	Syrris et al., 2006

**Tabelle 1:** ARVC verursachende Mutationen, AR= autosomal rezessiv, AD=auto-somal dominant, nach. (Corrado et al. 2009; Dalal et al. 2006)

### 1.7.1 PKP2-Mutationen

Basierend auf einem Knockout-Experiment an Mäusen konnte angenommen werden, dass auch Mutationen im humanen PKP-2-Gen zur Entstehung der ARVC führen können. (Hatzfeld et al. 2006) Die KO-Embryonen verstarben intrauterin um den Entwicklungstag 10.75 und zeigten deutliche Defekte in der kardialen Morphogenese (reduziertes Trabekelwerk, ungeordnetes Zytoskelett, Rupturen der Ventrikelwand und perikardialer Blutfluss). In elektronenmikroskopischen Aufnahmen und biochemischen Ergebnissen konnten stark reduzierte Assoziationen der Proteine Desmoplakin und Plakoglobin mit anderen Plaqueproteinen an den Glanzstreifen demonstriert werden. Zu einem ähnlich frühen Zeitpunkt in der kardialen Entwicklung wurden auch Deletionen im Armadillo-Protein Plakoglobin beschrieben. Dies zeigt, dass sich entwickelnde Herz besonders empfindlich gegenüber Veränderungen der Zelladhäsion in Kardiomyozyten reagiert. Da Plakophilin-2 die einzige Plakophilin-Isoform ist, welche in den Zellverbindungen des Myokards exprimiert wird, ist Plakophilin-2 ein essentielles Protein im myokardialen Zusammenhalt. (Grossmann et al. 2004)

Darauf folgten Sequenzierungen des menschlichen PKP2-Gens bei 120 nicht-verwandten Patienten mit ARVC diese zeigten eine heterozygote Mutation in 32 Individuen (Prävalenz von 27%). (Gerull et al. 2004) Weitere Studien bewiesen ebenfalls, dass PKP2-Mutationen gehäuft bei einer ARVC auftreten und PKP2 mit einer schwankenden Prävalenz zwischen 11-43 % das häufigste Krankheitsgen ist. (Dalal et al. 2006; van Tintelen et al. 2006; Syrris et al. 2006) Zum Großteil handelt es sich dabei um heterozygote Vererbung, Missense, Nonsense-Mutationen und Leserasterverschiebungen. Des Weiteren zeigte sich eine PKP2-Mutationsrate von 26% bei nicht-verwandten ARVC-Patienten. (Gerull et al. 2004; Dalal et al. 2006; Syrris et al. 2006; van Tintelen et al. 2006)

Patienten mit PKP2-Mutationen erkranken früher als Patienten mit ARVC ohne PKP2-Mutation. (Dalal et al. 2006) Van Tintelen et al. konnten 2006 signifikante Unterschiede zwischen Krankheitsbeginn und Inzidenz des PHT bei Patienten mit oder ohne PKP2-Mutation aufführen. (van Tintelen et al. 2006) Des Weiteren zeigten Patienten mit Mutation im PKP2 häufiger T-Wellen-Umkehrungen in den präkordialen Ableitungen im EKG als Nicht-Mutationsträger. Bei Verwandten von ARVC-Patienten fanden van Tintelen et al. in 11 Fällen von isolierter, nicht-familiärer ARVC keine PKP2-Mutation. Bei 23 Patienten mit gut dokumentierter familiärer ARVC wurde jedoch bei 70% der Probanden eine PKP2-Mutation gefunden. Innerhalb einer Familie zeigte sich eine hohe phänotypische Variabilität, trotz gleicher Mutation, es gab asymptomatische Patienten, Patienten mit frühem Krankheitsbeginn sowie Patienten, die früh an einem PHT verstarben. Die Penetranz stieg mit zunehmendem Alter und männlichem Geschlecht. (Dalal et al. 2006) Das gehäufte Auftreten von PKP2-Mutationen bei Menschen mit ARVC hängt wahrscheinlich von verschiedenen Faktoren ab. Studien an dänischen Probanden mit gleicher PKP2-Mutation zeigten eine Vererbung des gleichen Allels. (van Tintelen et al. 2006) Microsatelliten-Analysen bei einer größeren, heterozygoteren Bevölkerungsgruppe in Nordamerika (Dalal et al. 2006) und Westeuropa (Gerull et al. 2004) bestätigten die Vererbbarkeit der identischen Mutation bei nicht-verwandten Allelen. Diese immer wiederkehrenden Mutationen lassen vermuten, dass das PKP2-Gen genomische Regionen beinhaltet, die anfällig für Alterationen sind. Ein anderer möglicher Grund für die hohe Frequenz an PKP2-Mutationen bei nicht-verwandten Familien könnte das benachbarte Plakophilin-2-

Pseudogen sein, das auf Chromosom 12q13 lokalisiert ist (Bonne et al. 2000), welches eine Konversion des PKP2-Gens induzieren könnte. Wenn man die für Plakophilin 2 codierende Sequenz mit der des PKP2-Pseudogens vergleicht, so beinhaltet diese eine 4 bp Deletion entsprechend der c.145-148delCAGA- Mutation, die in verschiedenen unabhängigen Gruppen beschrieben wurde. (Dalal et al. 2006; Gerull et al. 2004; Syrris et al. 2006; van Tintelen et al. 2006)

Jedoch sind Spleißmutationen nicht kritisch wirksam, um Genkonversion zu verursachen, da PKP2P1 ein Pseudogen ist und daher keine Introns besitzt. Ein möglicher Mechanismus wiederkehrender Mutationen ist C>T Transition der CpG hotspots. Tatsächlich sind vier bekannte C>T PKP2-Mutationen an CpG Dinucleotiden aufgetreten. (c.235C>T, c.1237C>T, c.1951C>T und c.2203C>T)

Wie die PKP2-Mutation den kardialen Desmosomenaufbau stört und ihre Funktion bei der ARVC ist bisher nicht genau bekannt. Es wird vermutet, dass ein Mangel an Plakophilin 2 oder der Einbau von verändertem Plakophilin 2 die desmosomale Zell- zu Zell-Verbindung schädigt und, dass als Konsequenz daraus der Kontakt zur Nachbarzelle unterbrochen wird, besonders als Antwort auf mechanischen Stress oder Dehnung. Dies könnte auch eine annehmbare Erklärung für die hohe Prävalenz bei Athleten sein, so wie das häufige Auftreten ventrikulärer Tachyarrhythmien und PHT während sportlicher Betätigung und die Beteiligung des rechten Ventrikels. Interzelluläre Störungen treten zuerst in Bereichen mit hohem mechanischem Stress und Dehnung auf, d.h. am Apex, im rechtsventrikulären Ausflusstrakt und inferobasal (subtrikuspidal). Dies sind auch die pathologischen Prädilektionsstellen der ARVC. (Marcus et al. 1982)

Es wurden verschiedene Theorien zur Klärung des Krankheitsmechanismus vorgeschlagen, hier sei das einfache Strukturmodell erwähnt:

Der Verlust der Myocytadhäsion führt zum Zelltod und zur regionalen Fibrosierung. Dieser fokale Schaden im RV führt dann zur typischen Arrhythmie. Bei diesem Modell können Umweltfaktoren, wie Entzündung durch virale Infektionen oder Belastung die Adhäsion verschlechtern und das Fortschreiten beschleunigen. Außerdem besitzt der RV eine größere Neigung zur Erkrankung, da er dünnere Wände hat und da er auf Belastung mit einer Dilatation antwortet. Allerdings wird durch dieses Modell nicht



geklärt, warum der LV nicht betroffen ist und manche Patienten trotz eindeutiger desmosomaler Mutation erst später erkranken als andere. (Lahtinen et al. 2007; Asimaki et al. 2007)

## 1.8 Für RCM verantwortliche Mutationen im Troponin

### 1.8.1 TNNI-Mutationen

Zu den Herzerkrankungen, die mit Mutationen der Troponinuntereinheiten assoziiert sind, gehören HCM, DCM und RCM. Eine weitere mit Troponinmutationen einhergehende Erkrankung ist das myocardial stunning.

Es konnte bewiesen werden, dass Mutationen im kardialen Troponinkomplex, Troponin I (cTnI), Troponin T (cTnT) und Troponin C (cTnC) häufig für Kardiomyopathien verantwortlich sind. Die funktionellen Konsequenzen der cTnI- und cTnT-Mutationen, die zur HCM und/oder DCM führen, wurden untersucht. Es zeigte sich, dass diese Mutationen die regulatorischen Eigenschaften des Troponinkomplexes verändern, indem die  $Ca^{2+}$ -Sensitivität bei der Krafterzeugung zu- und abnimmt, was die Pathogenese der HCM und DCM bewirkt. (Yanaga et al. 1999; Nakaura et al. 1999; Harada et al. 2000; Morimoto et al. 1998; Morimoto et al. 1999; Morimoto et al. 2002; Lu et al. 2003)

Bisher wurden sechs *Missense* Mutationen im humanen, kardialen Troponin I (cTnI) gefunden, welche die restriktive Kardiomyopathie RCM verursachen (Leu144Gln, Arg145Trp, Ala171Thr, Lysq178Glu, Asp190Gly und Arg192His). Alle sechs RCM verursachenden Mutationen im cTnI sind hoch konserviert innerhalb verschiedener Tierarten und Geweben und es ist anzunehmen, dass diese Mutationen eine wichtige physiologische Funktion des cTnI verändern. (Mogensen et al. 2003)

Die meisten der Patienten mit diesen Mutationen litten unter Dyspnoe und Palpitationen. Drei der Mutationsträger (L144Q, D190G, R192H) verstarben am PHT. Zurzeit sind keine *in vitro* Ergebnisse für diese Klasse der Kardiomyopathien vorhanden. Es wäre durchaus möglich, dass ein gestörter Energiemetabolismus ein üblicher pathophysiologischer Faktor der RCM ist, aber die begrenzte Anzahl der

Patienten mit diesen Mutationen erschwert die Studien über den metabolischen Status dieser Patienten erheblich. (Huang et al. 2004)

Es sind mehr als 20 Mutationen im kardialen TnI-Gen bekannt, die mit der HCM assoziiert sind. Untersuchungen dieser Mutationen zeigten abhängig von der Mutation unterschiedlichste physiologische Effekte. (Gomes et al. 2004) Fünf cTnI-Mutationen, die mit der RCM assoziiert sind, wurden erforscht unter Benutzung von *in vitro* Proben, um den physiologischen K178E Effekt der Mutationen auf die Funktion von TNNI zu bestimmen. Die cTnI-Mutationen K178E und R192H konnten nicht bei den Eltern der Patienten nachgewiesen werden und wurden als *de novo* Mutationen klassifiziert. (Mogensen et al. 2003) Die K178E Mutation wurde bei einem Patienten entdeckt, bei dem im Alter von 6 Jahren eine idiopathische RCM diagnostiziert wurde. Dieser Patient wartete zur Zeit des Berichtes auf eine Herztransplantation. Der Patient mit der R192H Mutation starb im Alter von 19 Jahren am Herzversagen, während er auf ein Spenderherz zur Transplantation wartete. (Mogensen et al. 2003) Dieser Patient zeigte eine biatriale Erweiterung bei normaler systolischer Funktion. Bei zwei Patienten mit der R145W Mutation wurde erst mit Ende des 50. Lebensjahres eine RCM diagnostiziert. Diese beiden Patienten zeigten rechts- und linksatriale Erweiterungen zusammen mit Symptomen der Herzinsuffizienz. Die A171T Mutation wurde bei einer Person Ende des 50. Lebensjahres identifiziert. Die Trägerin der L144Q Mutation litt an Symptomen der Herzinsuffizienz mit 17 Jahren. Auch diese Patientin verstarb während sie auf eine Herztransplantation wartete im Alter von 33 Jahren. Von weiteren Mitgliedern ihrer Familie war bekannt, dass sie früh am PHT verstorben waren. Die entnommenen Biopsien einiger TnI RCM Patienten zeigten eine nicht-spezifische Fibrosierung und histologische Merkmale ähnlich der HCM.

Rekonstruierte Fasern, die alle der fünf Mutationen cTnI RCM Mutationen beinhalten, zeigten eine erhöhte  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensitivität bei der Kraftentwicklung. Die Fähigkeit zur ATPase-Aktivitätshemmung war bei allen fünf Mutationsträgern geringer als beim Wildtyp TnI.

Mutationen im cTnI, die mit der RCM assoziiert sind, zeigen *in vitro* ähnliche Merkmale wie cTnI Mutationen bei der HCM. Es gibt jedoch signifikante Unterschiede: 1. Die Erhöhung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensitivität ist höher als bei HCM, 2. es werden höhere

Kraftlevel verglichen mit der HCM erreicht, so wie 3. eine höhere ATPase-Aktivität erreicht. (Gomes et al. 2005)

Die RCM kann oft mit systemischen Erkrankungen assoziiert sein, ist aber sehr häufig idiopathisch. Es wurde eine große Familie detektiert, in der einige Mitglieder an idiopathischer RCM oder HCM erkrankt waren. Kopplungsanalysen, um Gene der sarkomeren, kontraktilen Protein zu untersuchen, ergaben das kardiale Troponin I (TNNI3) als wahrscheinlichstes Krankheitsgen. Spätere Mutationsanalysen deckten eine neue Missense Mutation auf, welche mit der Krankheit in der Familie kosegregierte (lod score 4,8). Um festzustellen, ob die RCM die klinische Expression der TNNI3 Mutation darstellt, wurden weitere genetische Untersuchungen an neun zusätzlichen nicht-verwandten Patienten mit restriktiver Füllungsstörung, biatrialer Dilatation, normaler systolischer Funktion und Wanddicke gemacht. Dabei wurden bei sechs von neun Patienten TNNI3-Mutationen identifiziert. Zwei dieser Mutationen, die bei jungen Patienten entdeckt wurden, waren *de novo* Mutationen. Alle Mutationen erschienen in konservierten und funktionell wichtigen Domänen des Gens. Die Identifikation von TNNI3 Mutationen bei idiopathischen RCM Patienten weist darauf hin, dass dieser Phänotyp zum Spektrum der erblichen Erkrankungen sarkomerer kontraktiler Proteine gehört.

In einer Untersuchung von Mogensen et al. 2003 wurde bei einem Kind und seiner Mutter eine RCM diagnostiziert. Ihre Familienanamnese ergab, dass 12 Personen plötzlich verstorben waren und das einige lebende Verwandte Symptome einer Herzerkrankung zeigten. Klinische Untersuchungen der Familie (H640) ergaben, dass ein weiteres Mitglied ebenfalls an RCM erkrankt war und neun Personen an einer HCM litten. Genetische Untersuchungen zeigten eine krankheitsverursachende Mutation in einer hoch konservierten Region des kardialen Troponin I Gens (TNNI3). Um die Hypothese zu überprüfen, ob die RCM eine klinische Expression dieser Mutation ist, führten Mogensen et al. 2003 weitere genetische Untersuchungen an neun zusätzlichen Patienten mit idiopathischer RCM durch.

Die Studie untersuchte Familie H640 (Proband 5.10 und 32 lebende Verwandte), sowie nicht-verwandte RCM Patienten und ihre Verwandten. Alle Probanden, die mit der Teilnahme einverstanden waren, nahmen an verschiedenen Untersuchungen teil:

körperliche Untersuchung, 12-Kanal-EKG, transthorakale 2-dimensionale Echokardiographie und Doppleruntersuchungen. Ausgewählte Patienten unterzogen sich einer Herzkatheteruntersuchung und einer rechtsventrikulären Biopsie. RCM-Diagnose, wenn: Füllung des linken Ventrikels eingeschränkt im Doppler,  $E/A > 2$ ,  $DT < 150\text{ms}$ ,  $IVRT < 70\text{ms}$ , LVED vermindert, Wanddicke und systolische Funktion normal.

Bis zur ersten Identifikation eines Krankheitsgens für HCM 1990, wurde angenommen, dass HCM, RCM und die erbliche Form der DCM unterschiedliche Entitäten sind. (Geisterfer-Lowrance et al. 1990; Seidman et al. 2001) Inzwischen weiß man aber, dass beide, HCM und DCM mit Mutationen des sarkomeren Gens assoziiert sein können. (Kamisago et al. 2000) Diese Forschungsergebnisse lassen vermuten, dass Variationen der Lokalisation der Mutation innerhalb der spezifischen, funktionellen Domäne der sarkomeren Krankheitsgene zu verschiedenen Phänotypen führen können. (Mogensen et al. 1999; Chen et al. 1999)

Die unterschiedlichen Expressionen der Phänotypen bei TNNI3 Mutationen lassen sich nicht mit dem aktuellen Wissensstand über TNNI (funktionale Bedeutung etc.) erklären und lassen vermuten, dass weitere genetische und Umweltfaktoren die Krankheitsexpression beeinflussen.

Die Tatsache, dass TNNI3-Mutationen in einem signifikanten Anteil der Patienten gefunden wurden, indiziert, dass die idiopathische RCM ein Teil der klinischen Expression der sarkomeren, kontraktilen Protein Erkrankungen und der HCM ist. Troponin I Erkrankungen sollten bei Patienten mit idiopathischer RCM berücksichtigt werden. (Mogensen et al. 2003)

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Chemikalien und Arbeitsmaterial

#### *Chemikalien:*

Agarose NEEO	Roth
Ammoniumpersulfat APS	AppliChem
Big Dye Terminator Mix	Applied Biosystems
Borsäure	Merck
Dimethylsulfoxid DMSO	Sigma
DNA-Marker (1kb DNA ladder)	MBI-.Fermentas
dNTP-Mix (10mM)	MBI- Fermentas
EDTA	Merck
Eppendorf-Caps (1,5ml, 2ml)	Eppendorf
Ethidiumbromid	Sigma
Falcon-Röhrchen(15ml, 50ml)	Greiner
Ficoll Paque TM Plus	Amersham Bioscience
Formamid	Sigma
Gene-Scan-500 (TAMRA size standard)	Applied Biosystems
H2O HPLC	AppliChem
Hanks gepufferte Salzmischung HBSS	AppliChem
KCl	Merck
KH <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Merck
Klebedeckel für PCR-Platten	PeqLab
Ladepuffer	MBI-Fermentas
MgCl <sub>2</sub> (25mM)	Applied Biosystems
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Merck

NaCl	Merck
Natriumacetat	Sigma
Papierkamm	MWG Biotech AG
PCR Goldpuffer 10x	Applied Biosystems
PCR-Platten 96er	Nerbe Plus
Performance Optimizer Polymer POP4	Applied Biosystems
Phenol (Wasser gesättigt)	
Phenol: Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1)	AppliChem
Pipettenspitzen	StarLab
Qiagen-PCR-Spin-Columns	Qiagen
SDS	Serva
TAE-Puffer 50x	AppliChem
Template Suppression reagent	Applied Biosystems
Tris(hydromethyl)aminomethan	Merck
Ultra Pure SequaGel Complete Buffer reagent	National Diagnostics
Ultra pure SequaGel XR	National Diagnostics

***Enzyme:***

DNA-Polymerase (amplitaq gold with gene amp)	Applied Biosystems
Proteinase K	Sigma
Restriktionsenzyme und Puffer	MBI Fermentas

**Geräte:**

ABI-Prism DNA Sequenzer 377	Perkin Elmer
ABI-Prism Genetic Analyzer 310	Perkin Elmer
Feinwaage Analytic AC 120S	Satorius
Geldokumentationsgerät Gelmax	Intas
Gelkammer	BioRad
Multikanalpipette 10µl, 100µl, 1000µl	Eppendorf
PCR-Maschine 24er GeneAmp	Perkin Elmer
PCR-System2400	
PCR-Maschine 384er GeneAmp	Applied Biosystems
PCR-System9700	
PCR-Maschine96er Primus 96 plus	MWG-Biotech
pH-Meter PHM 92	MeterLab
Pipette SL 2µl	Rainin
Pipetten 20µl, 200µl, 1000µl	Gilson
Speed Vac Plus SC 110	Savant
Thermomixer 5436	Eppendorf
UV-Spektrophotometer Ultraspec 2000	Pharmacia Biotech
Waage Laboratory LC 4800P	Satorius
Zentrifuge 5415 C	Eppendorf
Zentrifuge 5804	Eppendorf
Zentrifuge Sorval RT6000D	DuPont

***Puffer:***

10x PCR-Reaktionspuffer	150 mM Tris-HCl, pH 8,0 PBS 137mM NaCl 500 mM KCl 2,7 mM KCl 10mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 2mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
Puffer G plus	10 mM Tris-HCl, pH 7,5 10 mM MgCl <sub>2</sub> 50 mM NaCl 0,1 mg/ml BSA
Lysispuffer	10 mM Tris-Cl, pH 8,0 0,1 EDTA, pH 8,0 0,5 % (w/v) SDS
50x TAE	2 M Tris-Acetat 0,05 M EDTA auf pH 8,0 mit NaOH
TAMRA 500 1,5µl	1,07 µl Formamid 0,22 µl Puffer 0,22 µl GeneScan 500
6x Ladepuffer	0,25 % Bromphenol-Blau 0,25 % Xylen-Cyanol FF 15 % Ficoll in Wasser



10x TBE	107,8 g Tris-Base 55,0 g Borsäure 40 ml EDTA (0,5 M) pH-Wert 8,3
Ficoll-Paque	5,7 g Ficoll 400 9,0 g Natriumdiatrizoat
Monomerlösung	Sequalgel XR (National Diagnostics) Beinhaltet Harnstoff, Acrylamid und N`N`-Methylen-Bisacrylamid
Hanks-Lösung	140 mg Calciumchlorid 400 mg Kaliumchlorid 60 mg Kaliumhydrogencarbonat 97,67 mg Magnesiumsulfat 8 g Natriumchlorid 47,88 mg di- Natriumhydrogenphosphat 1 g D plus- Glucose
Pufferlösung	Sequalgel Complete Buffer reagent (National Diagnostics) enthält 5x TBE und TEMED

## 2.2 Polymerase-Ketten-Reaktion

Mit Hilfe der Polymerase-Ketten-Reaktion ist es möglich, selektiv eine DNA-Sequenz spezifischer Länge *in vitro* zu amplifizieren.

Voraussetzung für die PCR ist, dass die den Zielbereich flankierenden Sequenzen bekannt sind. Zu diesen Sequenzen werden zwei komplementäre Oligonukleotidprimer mit einer Länge von je 15-25 Nukleotiden synthetisiert, deren freie 3'OH-Enden der

hitze stabilen DNA-Polymerase aus dem Bacterium *Thermus aquaticus* als Startpunkt dienen.

Die Primer können mit Hilfe des Computerprogramms *OLIGO* (Version 4.0) konstruiert werden.

Dabei sollte beachtet werden, dass die Primermoleküle nicht komplementär zu einander sind, sich keine intramolekularen Haarnadelstrukturen ausbilden, und dass die Schmelztemperaturen  $T_m$  der beiden Primer in etwa gleich sind.

Für den Reaktionsansatz werden außer den Primern, der zu amplifizierenden DNA und der hitze stabilen Polymerase alle vier Desoxynukleotidtriphosphate (dNTPs) und ein geeigneter Reaktionspuffer benötigt, der Magnesiumionen enthält. Die  $Mg^{2+}$ -Ionen beeinflussen die Reaktivität der DNA-Polymerase dahin gehend, dass eine Erhöhung der Ionenkonzentration zwar zu einer gesteigerten Produktausbeute führt, aber gleichzeitig zur Abnahme der Spezifität der Reaktion, was die Amplifikation unerwünschter Nebenprodukte begünstigt.

Die PCR wird in einem automatisierten Thermocycler durchgeführt und umfasst die folgenden sich wiederholenden Temperaturzyklen, die in der Regel 25-35 mal durchlaufen werden:

### ***Denaturieren***

Durch kurzzeitiges Erhitzen der Lösung auf  $95^{\circ}C$  trennen sich die beiden DNA-Stränge, da die Schmelztemperatur  $T_m$  überschritten wird.

### ***Hybridisierung der Primer***

Während des Abkühlens der Reaktion hybridisiert jeder Primer mit dem zu ihm komplementären DNA-Stück. Die Anlagerungstemperatur wird spezifisch für jedes Primerpaar gewählt. Da die Primer in großem Überschuss zugegeben werden, kommt es nicht zur erneuten Bildung des Doppelstranges.

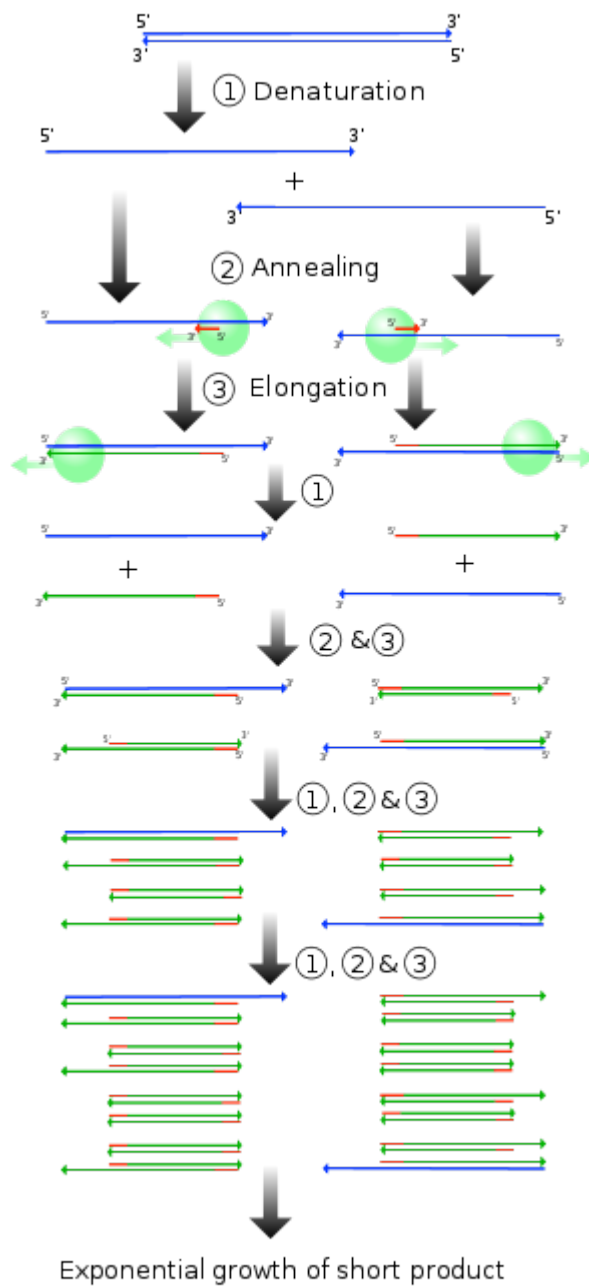
### ***Kettenverlängerung***

Die DNA-Synthese erfolgt beim Temperaturoptimum der DNA-Polymerase von  $72^{\circ}C$ . Die Polymerase katalysiert die Addition der 5'-Phosphatgruppe der einzelnen Desoxynucleotide an das freie 3'-OH-Ende des wachsenden DNA-Stranges, so dass zu

dem vorhandenen Einzelstrang ein komplementärer Strang synthetisiert wird. Nun liegt wieder ein doppelsträngiges DNA-Molekül vor und der nächste Zyklus beginnt.

Die Verwendung einer *Hotstart*-Polymerase ermöglicht es die Anzahl unspezifischer Artefakte zu verringern. Die *Hotstart*-Polymerase ist mit einem Antikörper gekoppelt, der die Polymeraseaktivität inhibiert. Beim Erhitzen der Reaktion für 15 min auf 95°C denaturiert der Antikörper und dissoziiert von der Polymerase. Dies garantiert, dass die Polymerase erst bei einer ausreichend hohen Temperatur aktiv wird, bei der die Primer spezifisch an die DNA binden.

Ein typisches PCR-Programm, das in einem Thermocycler (*Biometra*) durchgeführt wurde, bestand aus einer initialen Aktivierung der *Hotstart*-Polymerase für 15 min bei 95°C. Es folgten 35 Zyklen, bestehend aus jeweils einem Denaturierungsschritt, einem Annealingschritt und einem Elongationsschritt, gefolgt von einem letzten Elongationsschritt für 10 min bei 72°C. Die Annealingtemperatur variierte je nach den verwendeten Primern zwischen 62°C und 55°C. Um eine höhere Spezifität der Reaktion zu garantieren, wurde in einigen Fällen auch eine *Touch-Down*-PCR angewendet. Dabei wurde die Annealingtemperatur, ausgehend von einer hohen Temperatur in den ersten 10 Zyklen schrittweise (1°C / 2 Zyklen) gesenkt. Bei der *Touch-Down*-PCR werden in den ersten Zyklen weniger PCR-Produkte gebildet, dafür binden die Primer aber mit einer höheren Spezifität. Die Elongationszeit (1 min pro 1 kb) wurde an die Länge des zu erwartenden PCR-Produktes angepasst.



**Abb. 5 Schematische Darstellung des PCR-Zyklus.** Abbildung entnommen aus (Alberts 2002)

1. Strangtrennung/ Denaturierung
2. Anlagerung der Primer/ Annealing
3. Kettenverlängerung/ Elongation
4. Der erste Zyklus ist beendet und ein nächster beginnt

### 2.2.1 Standardprotokoll für eine PCR-Reaktion

Für einen 50 µl Reaktionsansatz wurden 5 µl 10x Reaktionspuffer (Applied Biosystems), 3µl MgCl<sub>2</sub> (25mM), 1µl dNTPs (MBI Fermentas, 10 mM), 0,5 µl DNA-Polymeraase (AmpliTaQ Gold von Applied Biosystems, 5 Units/µl), je 1 µl der beiden Primer (10mM) und ~ 50 ng genomische DNA gemischt.

Die Temperaturzyklen der PCR wurden mit folgendem standardisiertem Programm in einem Thermocycler von Perkin Elmer (GeneAmp PCR System 2400) durchgeführt:

1. Aktivierung	95°C 15 min	Schritt 2 – 4 für 35 Zyklen
2. Denaturierung	95°C 30 sec	
3. Annealing	60°C Zeitvariabel	
4. Elongation	72°C 1 min/kb	

Tabelle 2

### 2.2.2 DNA-Isolation

Zur Isolation genomischer DNA aus EDTA-Blut wurde das Blut mit gleichem Volumen PBS gemischt. Durch Zentrifugation (3.000 rpm in Sorvall RT 6000, DuPont) präzipitierten die kernhaltigen Leukozyten, die Erythrozyten blieben weitgehend im Überstand. Das Leukozytenpellet wurde in 1ml Lysispuffer resuspendiert und für 1 h bei 37°C inkubiert. Dann wurde der Lösung Proteinase K (Sigma, 20mg/ml) in einer Endkonzentration von 100µg/ml zugesetzt und für eine weitere Stunde bei 50°C inkubiert. Um die DNA von Proteinen zu reinigen, wurde die Lösung mit gleichem Volumen Phenol (Tris-HCl, AppliChem) versetzt und beide Phasen gemischt. Ein Zentrifugationsschritt für 15 min bei 3.000 rpm in Sorvall RT 6000D, DuPont führte zur Trennung in eine untere organische Phase und eine obere wässrige Phase. Die Proteine sammelten sich in der Interphase. Die obere wässrige Phase mit den gelösten Nukleinsäuren wurde vorsichtig abgenommen. Verunreinigungen mit Phenolresten in

der wässrigen Phase wurden durch Behandlung mit einem Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Gemisch (25:24:1, AppliChem) entfernt. Die Fällung der DNA erfolgte durch Zugabe von 0,1 Volumen Natriumacetat (3 M; pH 5,2) und zwei Volumen 100 % Ethanol. Das DNA-Pellet wurde mit 70 % (v/v) Ethanol gewaschen, 10 min bei Raumtemperatur getrocknet und anschließend in H<sub>2</sub>O resuspendiert. Die DNA-Lösung wurde bei 4°C, oder für längere Perioden bei -20°C, gelagert.

### 2.2.3 RNA-Isolation

Die RNA-Extraktion aus Leukozyten erfolgte mit *peqGOLD RNAPure* (*peqlab*), einer einphasigen Lösung aus Phenol und Guanidinisothiocyanat GTC. GTC ist ein chaotropes Salz und denaturiert Proteine, während durch Zugabe von Phenol und Chloroform die Proteine und DNA-Fragmente von der RNA getrennt werden.

5 x 10<sup>6</sup> Zellen wurden in 500 µl *peqGold RNAPure* lysiert und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Zugabe von 100 µl Chloroform und einer anschließenden Zentrifugation für 5 min bei 12.000 g trennte sich das Homogenat in drei Phasen. Die untere Phenol-Chloroform-Phase und die Interphase enthielten hauptsächlich Proteine und DNA, während sich die RNA in der oberen wässrigen Phase anreicherte. Nach Überführung der wässrigen Phase in ein frisches Gefäß wurde die RNA durch Zugabe von 250 µl Isopropanol gefällt und in einem Zentrifugationsschritt für 10 min bei 10.000 g präzipitiert. Das RNA-Pellet wurde mit 75 % Ethanol gewaschen, 5 min bei Raumtemperatur getrocknet und in 50 µl RNase freiem Wasser resuspendiert.

### 2.2.4 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäurelösungen

Konzentrationen von Nukleinsäurelösungen wurden durch Messung der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 260 nm in dem Spektrophotometer UV-1601 (*Shimadzu*) bestimmt. Die Nukleinsäurekonzentration (c) errechnete sich aus der gemessenen OD bei 260 nm (OD<sub>260</sub>), dem Verdünnungsfaktor (V) und einem spezifischen Multiplikationsfaktor (F) für DNA (F = 50) oder RNA (F = 40).

$$c \quad [\mu\text{g/ml}] \quad = \quad \text{OD}_{260} \quad \times \quad V \quad \times \quad F \quad [\mu\text{g/ml}]$$

Durch eine zusätzliche Bestimmung der OD bei 280 nm erhielt man aus dem Verhältnis der OD<sub>260nm</sub> und der OD<sub>280nm</sub> eine Aussage über die Verunreinigung der Lösung mit Proteinen. In der Regel weisen proteinfreie Nukleinsäurelösungen ein Verhältnis von 1,8 – 2,0 auf.

### **2.2.5 Reverse Transkription**

Die Reverse Transkription ist eine Methode, um von einer RNA cDNA-Kopien herzustellen. Dabei hybridisiert zuerst ein Primer an die RNA, den anschließend eine RNA-abhängigen DNA-Polymerase verlängert. In der Regel werden Oligo-dT- oder *Random*-Hexamer-Primer verwendet. Oligo-dT-Primer binden selektiv an die Poly-A-Schwänze von mRNA, während die zufälligen Hexamer-Primer irgendwo an die RNA hybridisieren.

Für die cDNA-Synthese wurden 2 µg Gesamt-RNA mit 1 µl Hexamer-Primern (50 ng/µl) und 1 µl dNTPs (10 mM each) gemischt und für 5 min bei 65°C denaturiert. Anschließend wurden 4 µl 5 x RT-Puffer (*Invitrogen*), 1 µl 0,1 M DTT, 1 µl SuperScript III Reverse-Transkriptase (200 U/µl) (*Invitrogen*) und 1 µl RNase-Inhibitor *RNaseOUT* (40 U/µl) (*Invitrogen*) dazu pipettiert und die Reaktion 10 min bei 25°C inkubiert, um eine Anlagerung der Primer an die RNA zu ermöglichen. Die Synthese der cDNA erfolgte bei 50°C für 60 min. Die Reverse-Transkriptase wurde durch eine Erwärmung der Reaktion auf 70°C für 15 min inaktiviert.

5 x RT-Puffer 250 mM Tris-HCl, pH 8, 3

375 mM KCl

15 mM MgCl<sub>2</sub>

### **2.2.6 Agarose-Gelelektrophorese**

Die Agarose-Gelelektrophorese ermöglicht eine schnelle Trennung von DNA-Fragmenten und die Bestimmung ihrer Größe sowie deren Quantifizierung.

Für das Gel wurde Standard-Agarose (*Sigma*) in 1 x TAE-Puffer aufgekocht und Ethidiumbromid (Endkonzentration 0,5 µg/ml) zugegeben. Je nach zu erwartenden Fragmentgrößen wurden Agarosekonzentrationen zwischen 0,8 % für größere Fragmente (> 1 kb) und 2 % für kleinere Fragmente (~ 100 bp) verwendet. Die Proben wurden mit 1/6 Volumen Ladebuffer versetzt. Der Ladebuffer erhöhte die Dichte der Proben und diente der Kontrolle des Laufverhaltens der Proben. Als Größenstandard und zur Bestimmung von DNA-Konzentrationen wurde der 100 bp- oder 1 kb-Marker von *Fermentas* verwendet. Die Elektrophorese erfolgte bei einer Spannung von 100 Volt in einer *MINI-SUB*-Elektrophoresekammer von *BioRad*. Die Gele wurden unter UV-Licht mit dem *GelJet Imager*(*INTAS, Göttingen*)dokumentiert.

6 x Ladebuffer 0,25 % Bromphenol Blau

0,25 % Xylen-Cyanol FF

15 % Ficoll in Wasser

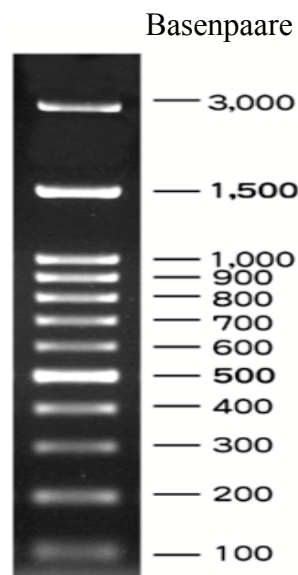
50 x TAE 2 M Tris-Acetat

0,05 M EDTA

auf pH 8,0 mit NaOH

100 bp DNA Marker: 3000bp, 2000bp, 1500bp, 1200bp, 1000bp, 900bp, 800bp,  
700bp, 600bp, 500bp, 400bp, 300bp, 200bp, 100bp





**Abb. 6** 1 kb DNA Marker: 10.000bp, 8000bp, 6000bp, 5000bp, 4000bp, 3500bp, 3000bp, 2500bp, 2000bp, 1500bp, 1000bp, 750bp, 500bp, 250bp

### 2.3 Mutationsanalyse von Kandidatengen

Die innerhalb der Kandidatenregion liegenden Gene und ihre Exon-Intron Struktur wurden der humanen Referenzsequenz des *International Human Sequencing Consortium* (NCBI Build 35, May 2004) entnommen. Zur Mutationanalyse wurden die proteinkodierenden Exons der Kandidatengene sowie wenigstens 50 bp der flankierenden Introns sequenziert. Primer für die Amplifikation der entsprechenden DNA-Sequenzen wurden unter Verwendung der Primer3-Software des *Whitehead Instituts* ausgewählt. Die Primer wurden nach folgenden Kriterien erstellt::

Primerlänge 18 - 25 bp

nicht mehr als vier gleiche Basen hintereinander

Länge des PCR-Produktes nicht größer als 600 bp

Schmelztemperatur der Primer um 60°C für ausreichend hohe Annealingtemperatur

Primer keine Hybridisierung miteinander

keine Bildung von intramolekularen Haarnadelstrukturen

Die PCR-Amplifikation der proteinkodierenden Exons erfolgte in einer 20 µl-Reaktion. Überschüssige Primer und dNTPs wurden anschließend durch einen Verdau mit einer Mischung aus 0,2 Units Exonuklease (*New England Biolabs*) und 0,4 Units alkalischer Phosphatase (*Shrimp Alkaline Phosphatase, GE Healthcare*) für 30 min bei 37°C entfernt. Nach der Inaktivierung der Enzyme für 15 min bei 80°C erfolgte die Sequenzierreaktion.

## **2.4 DNA-Sequenzierung**

Die DNA-Sequenzierung erfolgte nach der *Cycle-Sequencing*-Methode, einer Weiterentwicklung der enzymatischen Didesoxy-Methode von Sanger et al. (1977). Dabei synthetisierte eine DNA-Polymerase anhand von DNA-Matrizen (PCR-Produkte) in einer zyklischen, enzymatischen Reaktion DNA-Fragmente. Zusätzlich zu den normalen Desoxynukleotiden (dNTP) enthält die Reaktion aber noch Didesoxynukleotide (ddNTP). Der Einbau eines ddNTP während der Elongation, verhindert die Ausbildung einer weiteren Phosphodiesterbindung und führt zu einem vorzeitigen Abbruch der Elongationsreaktion. Durch einen Überschuss an dNTPs gegenüber ddNTPs im Reaktionsansatz treten die Kettenabbrüche statistisch gesehen an jeder möglichen Basenposition in der Sequenz auf. So entstehen DNA-Fragmente jeder Länge, die jeweils mit der Primersequenz beginnen und mit einem ddNTP enden. In dem verwendeten Reaktionskit sind die ddNTPs entsprechend ihrer Basen mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen gekoppelt, die nach Anregung durch einen Laser detektiert werden können.

Die Sequenzierreaktion erfolgte mit dem *BigDye TerminatorMix 3.1* nach dem entsprechenden Protokoll von *Applied Biosystems* in einem Thermocycler (*Biometra*).

Sequenzierprogramm		Zyklen
1. Denaturierung	96°C 10 sek	
2. Annealing	50°C Zeit variabel	
3. Elongation	60°C 4 min	27 Zyklen
		Schritt 1-3

**Tabelle 3**

Die Produkte der Sequenzierreaktion wurden durch Zugabe von 1/10 Volumen Natriumacetat (3 M; pH 5,2) und zwei Volumen Ethanol (100 %) gefällt und anschließend in einem Zentrifugationsschritt für 30 min bei 13.000 g und 4°C präzipitiert. Das entstandene Pellet wurde mit 70 % (v/v) Ethanol gewaschen, erneut für 10 min bei 13.000 g abzentrifugiert und anschließend für 5 min in einer Vakuumzentrifuge getrocknet.

Für die Auftrennung und Analyse der DNA-Fragmente mit dem *DNA Sequenzer 377 (Applied Biosystems)* wurde das Pellet in 2 µl Probenpuffer resuspendiert und in die Geltaschen pipettiert. Die Auftrennung erfolgte elektrophoretisch in einem 6 %igen Polyacrylamidgel (Herstellung des Gels siehe Kapitel 2.2.6).

Erfolgte die Auftrennung und Analyse der DNA-Fragmente mit dem Kapillarsequenzer *Genetic Analyzer 3130 (Applied Biosystems)*, wurde das Pellet in 10 µl *HiDi Formamid (Applied Biosystems)* resuspendiert. Bei der Kapillar-Elektrophorese diente das Polymer POP7 (*Applied Biosystems*) als Trennmedium. Die im Formamid aufgenommene DNA wurde durch elektrostatische Wechselwirkungen in die Kapillaren injiziert und elektrophoretisch aufgetrennt. Die fluoreszenz-markierten DNA-Fragmente wurden am Ende der Kapillare angeregt, das emittierte Licht von einer CCD-Kamera registriert und die Daten mit Hilfe der *Sequencing Analysis Software v5.0 (Applied Biosystems)* analysiert und ausgewertet.

Probenpuffer (377): 5 Volumen Formamid

1 Volumen 25 mM EDTA (pH 8,0)

50 mg/ml Dextranblau

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Familie A

Die Größe der Familie A reichte für eine Kopplungsanalyse nicht aus, deshalb sollte durch Direktsequenzierung eines Kandidatengens eine mögliche Nukleotidveränderung identifiziert werden. In 80% der Fälle wird bei der ARVC eine genetische Komponente vermutet. 50% der symptomatischen Patienten besitzen eine Mutation in unterschiedlichen Bestandteilen der kardialen Desmosomen. (Awad et al 2008) Bisher wurden 9 Genmutationen nachgewiesen. (Gerull et al. 2004) In verschiedenen Studien schwankt die Prävalenz zwischen 11-43% für das Plakophilin-2-Gen, das damit das häufigste Krankheitsgen darstellt. (Dalal et al. 2006; Gerull et al. 2004; Syrris et al. 2006; van Tintelen et al. 2006) Des Weiteren ist durch Studien, wie das Knockout-Experiment in der Maus, die Wichtigkeit von PKP2 für die Herzmorphogenese und Bildung von normalen Zell-Zell-Kontakten gezeigt worden. (Grossmann et al. 2004) Aus diesen Gründen wurde das PKP-2-Gen von uns als Kandidatengens für die Sequenzierung der Familie A gewählt.

Das Plakophilin-2-Gen liegt auf Chromosom 12, Location 12p11. In Familie A wurden alle kodierenden 14Exons (siehe Abb.7), einschließlich der flankierenden Intronsequenzen, Promotorregionen und untranslatierter Regionen durch PCR mit genomischer DNA von den eineiigen Zwillingen II-2 und II-3 amplifiziert. Die Primer wurden intronisch gelegt, ca. 50bp weit vom zu amplifizierenden Exon entfernt, um eventuelle Mutationen an Spleißstellen zu identifizieren. Die Primer wurden mit Hilfe der Software *WhiteheadInstitutes* hergestellt. Bei ihrer Auswahl wurden eine Primerlänge von 18 - 25 bp und eine Schmelztemperatur um 60°C gewählt. Die Größe der PCR-Produkte sollte nicht länger als 600 bp sein, es sollten nicht mehr als vier gleiche Basen hintereinander vorkommen und keine Bildung von intramolekularen Haarnadelstrukturen entstehen. Die Sequenzierung der PCR-Produkte erfolgte wie in Kapitel 2.4 beschrieben.

Exon	Sequenz	AT C°
1 forward	5'-CCC GCG AGT CCA GAG GCA G-3'	66,0
1 reverse	5'-ACT CGG TCA TAC CGA AGA CG-3'	60,5
2 forward	5'-ATA TCC CAG GGT GGT GTG AA-3'	57,3
2 reverse	5'-TGT TTC ACA TCC CTA GTT TTC CA-3'	57,1
3 forward	5'-CCC AGA GTA ATT AGT CCT CAG CA-3'	60,6
3 reverse	5'-CTC ATG CTG TCA GGG CTG T-3'	58,8
4 forward	5'-GTC TCT GGA GGA CCA GGT TG-3'	61,4
4 reverse	5'-TTG GTT TCA GTG TCC AAA GTC-3'	55,9
5 forward	5'-TCT ACA AGA GCC TCA GTT GTG C-3'	60,3
5 reverse	5'-AGC CCA TCA ATC ATT TGC TC-3'	55,3
6 forward	5'-TGC ATG AAG CCT AAT GTG TTC-3'	57,4
6 reverse	5'-CGG TAA CCT AGG CTG GAG TG-3'	62,5
7 forward	5'-CAT AGC CCT GGA GTT GAT GG-3'	59,4

7 reverse	5'-AGA AAA GAA CCA AAG GCA GAA-3'	54,0
8 forward	5'-TCC AAA CAC CTG GAA GAA GC-3'	57,3
8 reverse	5'-AAC CTA AAA CCA AGC GGC TA-3'	55,3
9 forward	5'-AAC CCG CAG TTT AAG CAC AC-3'	57,3
9 reverse	5'-TGT GTC TCT GTT TCC TCA CTG G-3'	60,3
10 forward	5'-GGT CTC CTG GTT TGA GTG TGA-3'	59,8
10 reverse	5'-CCG AAG CCC TCT GTA ATT TCT-3'	57,9
11 forward	5'-TCC AGC CTG AAT GAC AGA GA- 3'	57,3
11 reverse	5'-ATC TTT GTG AAC GGG AGG TG- 3'	57,3
12 forward	5'-CTG GGC AAC AGA GCA AGA TT-3'	57,3
12 reverse	5'-GCA CAT TCA CAA CCG GAT TA- 3'	55,3
13 +14 forward	5'-AGC AGT TGA GGA GCG AAG AG-3'	59,4
13 +14 reverse	5'-CAA GGC ATG CTT TTG AGG TT- 3'	55,3
14 utr 1 forward	5'-TTT GGT TAT TCC AAAA GGC TCA-3'	55,5

14 utr 1 reverse	5'-GAA AAA CAA CCC AAG GGG ATA-3'	57,4
14 utr 2 forward	5'-CAT TGG GCC TCC AGT GTA TT- 3'	58,4
14 utr 2 reverse	5'-TCA TTT CGC TGG ATG ATG TC- 3'	56,4
14 utr 3 forward	5'-TTC AAG CCA TTA TTT TAA CTC AAG AA-3'	58,4
14 utr 3 reverse	5'-CCT CAA ATT TTA TGT CAA TCA TAC CA-3'	60,0

**Tabelle 4 PKP2 Primertabelle DNA**

Exon	Sequenz	AT C°
116 forward	5'-CAG CAG ATC CTG GGA CAA CT-3'	60,5
116 reverse	5'-GTC AGG CTG GTC TCG AAC TC-3'	62,5
1347 forward	5'-ACA AAT TGG AGG TGG CTG AA-3'	56,4
1347 reverse	5'-CAT GGG AAC CAG AAA AGG AA-3'	56,4
2027 forward	5'-AAA GAG CAA TAC CAG GAC GTG- 3'	59,4
2027 reverse	5'-AGG TCA GTA CTC GGG ACT GTG-3'	63,3
2738 forward	5'-AAT CCC CAA AGG AAA ACA CC-3'	56,4
2738 reverse	5'-GGA GGA ATA AAT GCA CTC CAA-3'	57,4

**Tabelle 5 PKP2 Primertabelle cDNA**

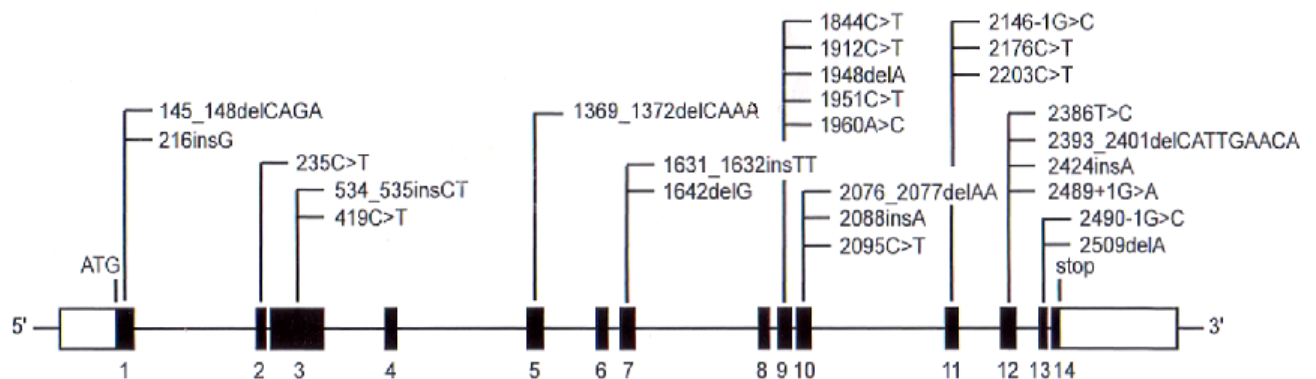
Exon	Sequenz	AT C°
Prom742 forward	5'-CTC TGT CTG GGT GTG TTC GT-3'	60,5
Prom 742 reverse	5'-CTG TCC AGT TGT CCC AGG AT-3'	60,5
Prom 1551 forward	5'-CTC AGC ATC ATG GTT GGA TG-3'	58,4
Prom 1551 reverse	5'-AGG GAA ATG TGC CAA GAA GA-3'	56,4
Prom 2276 forward	5'-CCC TTT GCT CAG CTT TCA TT-3'	56,4
Prom 2276 reverse	5'-TCC AGG GAG TGA AGA GGA AA-3'	58,4

**Tabelle 6 PKP2 Primertabelle Promotorregionen**

Exon	Sequenz	AT C°
long 2 forward	5'-GTT TAA TAC TTG TTC TTG GCC TTC A-3'	60,9
long 4 reverse	5'-TGC AAA GTC ACC ATA ATA GAA GTG A-3'	60,9
long 5 forward	5'-ATA GCC GGG GTA TAT TCT ACA AGA G-3'	64,1
long 7 reverse	5'-ACT AGA AAA GAA CCA AAG GCA GAA T-3'	60,9
long 11 forward	5'-CAT CTT CAT CAG CCT CTG GTA ATC T-3'	62,5
long 14 reverse	5'-TCT GGG AGG AAA AGA CTT CTT TAA T-3'	60,9

**Tabelle 7 PKP2 Primertabelle long rang**

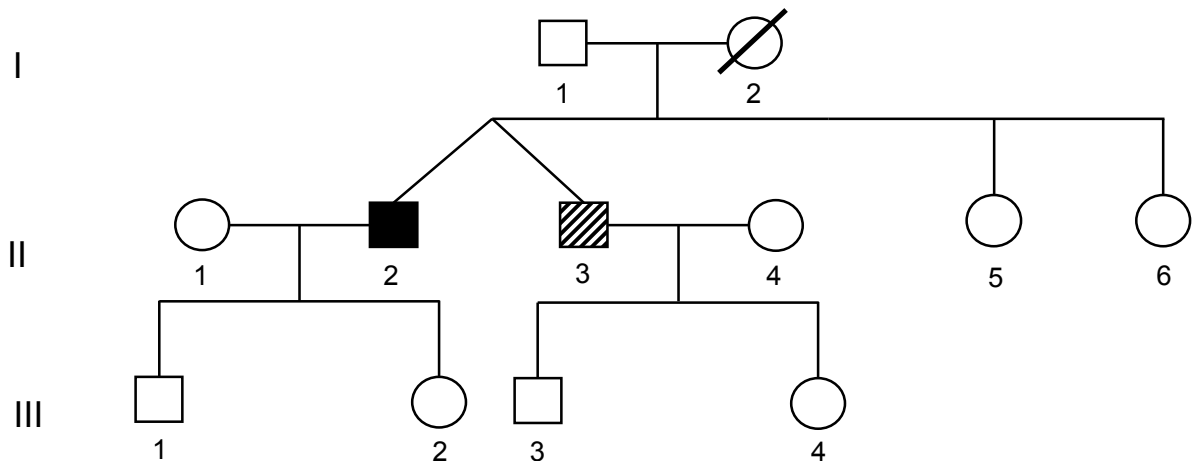




**Abb. 7 Genomische Struktur von Plakophilin 2 mit ARVC assoziierten Mutationen.** Das humane Gen für Plakophilin 2 hat 14 Exone, die Nummerierung der Nukleotide beginnt beim ATG und bezieht sich auf die Genbank-Zugriffsnummer X97675. Die Positionen der 25 gefundenen Mutationen in ARVC-Patienten sind anhand der genomischen Sequenz dargestellt. Nach (Gerull et al. 2004).

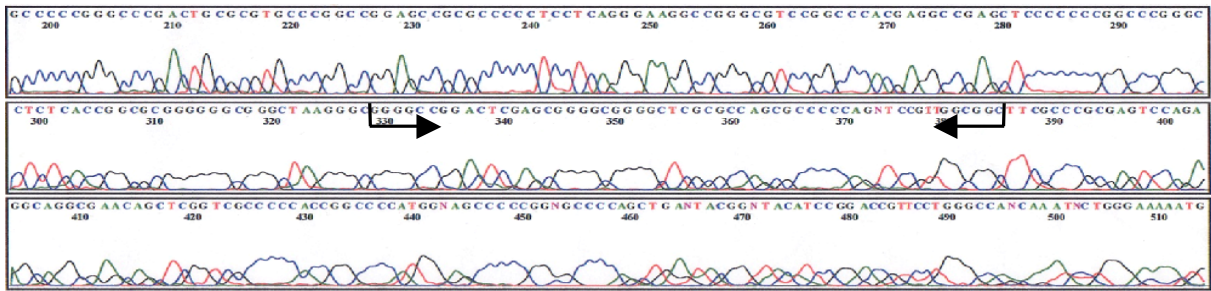
Bei Familie A wurden die eineiigen Zwillingbrüder II-2 und II-3 untersucht. Patient II-2 war klinisch an einer fortgeschrittenen ARVC erkrankt. Er litt seit seinem 39. Lebensjahr an ventrikulären Tachykardien und hatte einen Defibrillator (ICD) implantiert. Sein Zwillingbruder II-3 wies mit 47 Jahren noch keine klinischen Symptome auf, zeigte aber in der Echokardiographie Fetteinlagerungen im Myokard und eine eingeschränkte Pumpfunktion des leicht vergrößerten rechten Ventrikels. Beide Patienten müssen identische Mutationen besitzen, zeigten aber eine unterschiedliche klinische Ausprägung des Krankheitsbildes. Die Mutter I-2 der Brüder verstarb im Alter von 62 Jahren an einem Hirntumor. Der 76 Jahre alte Vater I-1 und die Kinder der Zwillingbrüder nahmen nicht an der Untersuchung teil.

## Familie A

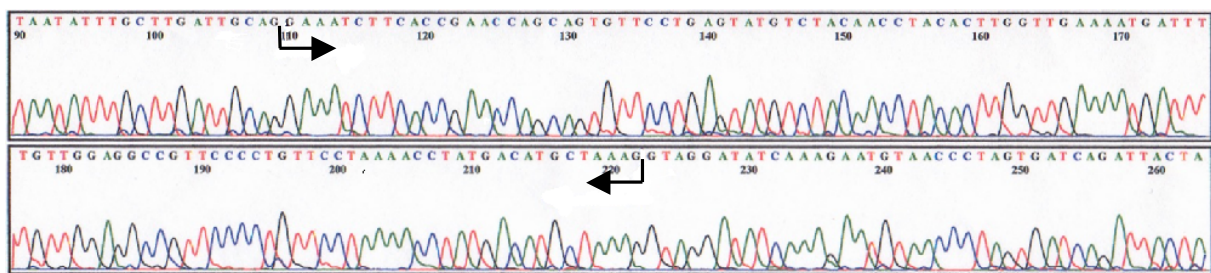


**Abb. 8 Stammbaum der Familie A.** Schwarze Symbole repräsentieren betroffene, symptomatische Individuen; gestreifte Symbole betroffene, aber asymptomatische Patienten; leere Symbole markieren gesunde oder nicht untersuchte Personen, durchgestrichene Symbole zeigen bereits verstorbene Mitglieder

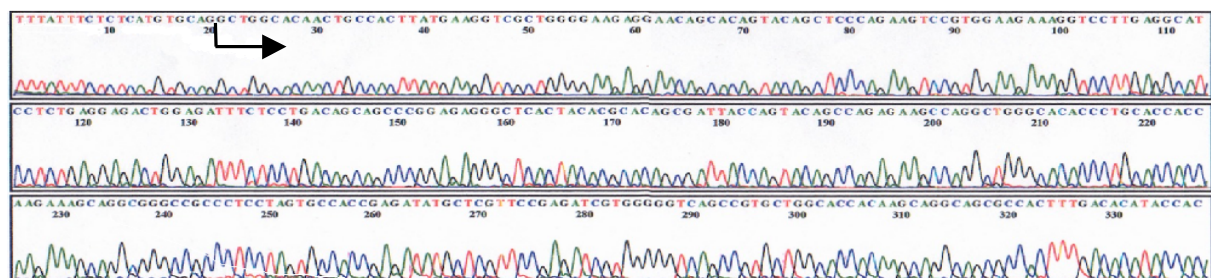
Die folgenden Abbildungen zeigen die DNA-Sequenzen von PKP2 Exon 1 bis 14. Die eckigen Pfeile  $\hookrightarrow$   $\longleftarrow$  begrenzen das jeweilige Exon.



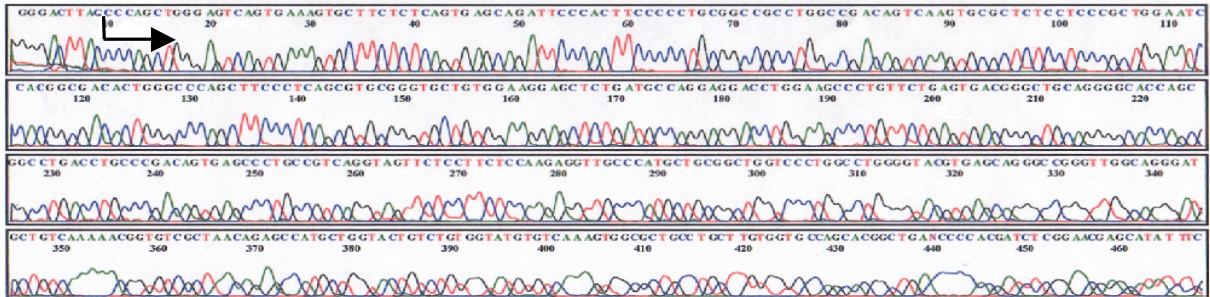
**Abb. 9** Patient II-3. Ausschnitt aus DNA-Sequenz von PKP2 Exon 1 sequenziert mit *forward-Primer*



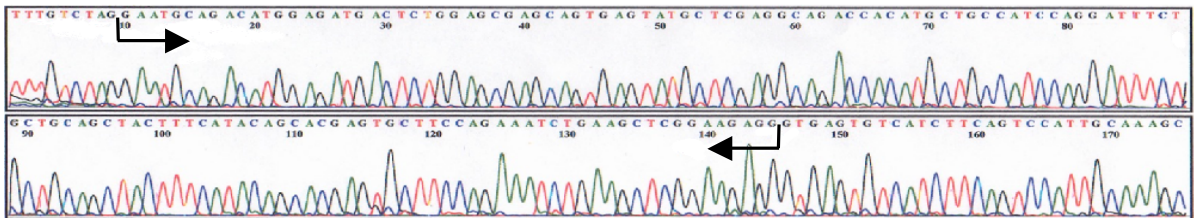
**Abb. 10** Patient II-2. Ausschnitt der DNA-Sequenz von PKP2 Exon 2 sequenziert mit *forward-Primer*



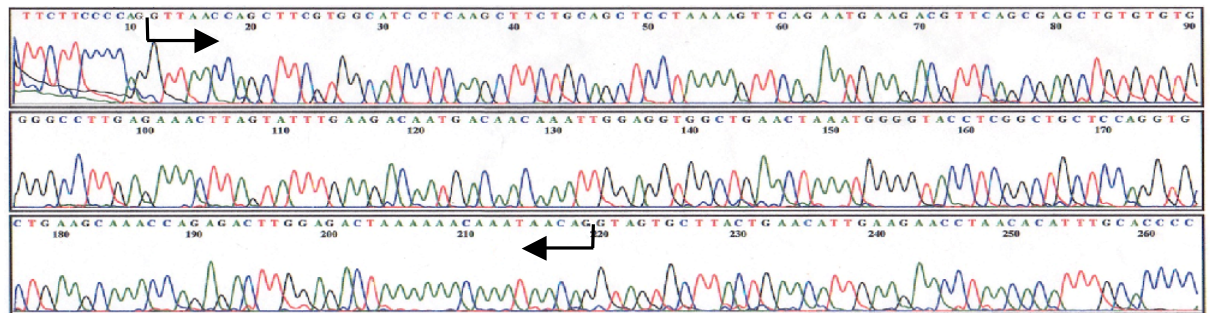
**Abb. 11** Patient II-2. Ausschnitt der DNA-Sequenz von PKP2 Exon 3 mit *forward-Primer* sequenziert. Exon zu lang, 845 bp, deshalb reverse wiederholt



**Abb. 12** Patient II-3. Ausschnitt der DNA-Sequenz von PKP2 Exon 3 sequenziert mit *reverse-Primer*.

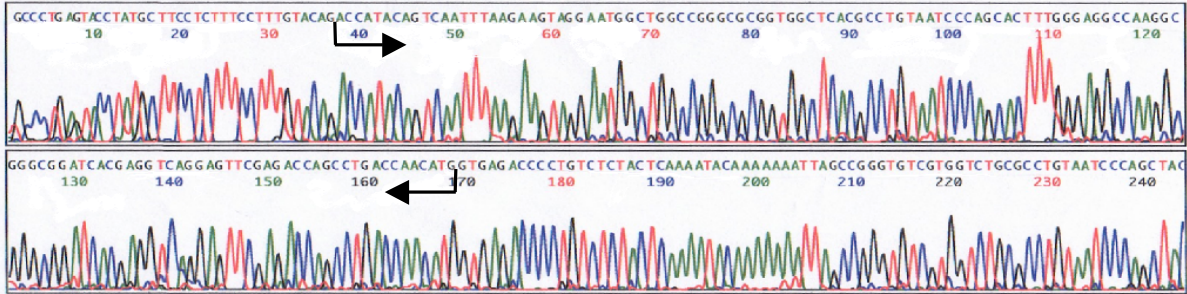


**Abb. 13** Patient II-2. Ausschnitt DNA-Sequenz von PKP2 Exon 4 mit *forward-Primer*.

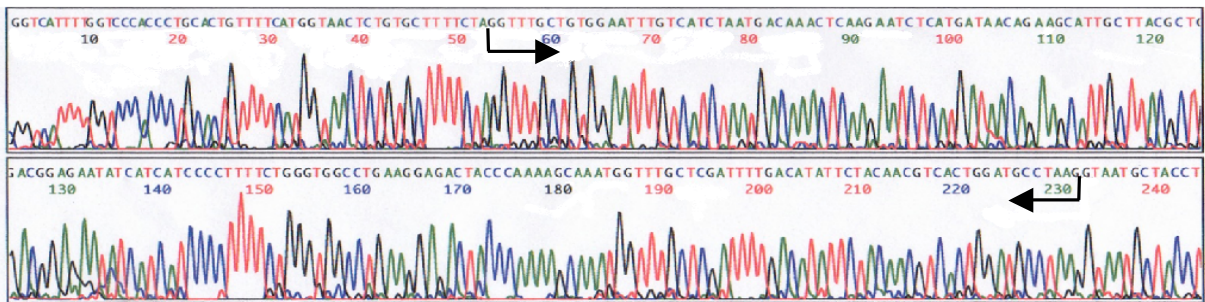


**Abb. 14** Patient II-2. Ausschnitt der DNA-Sequenz von PKP2 Exon 5 sequenziert mit *forward-Primer*.

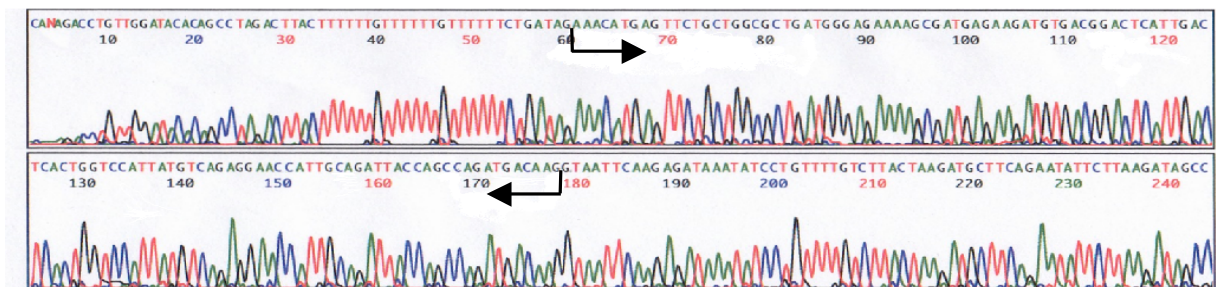




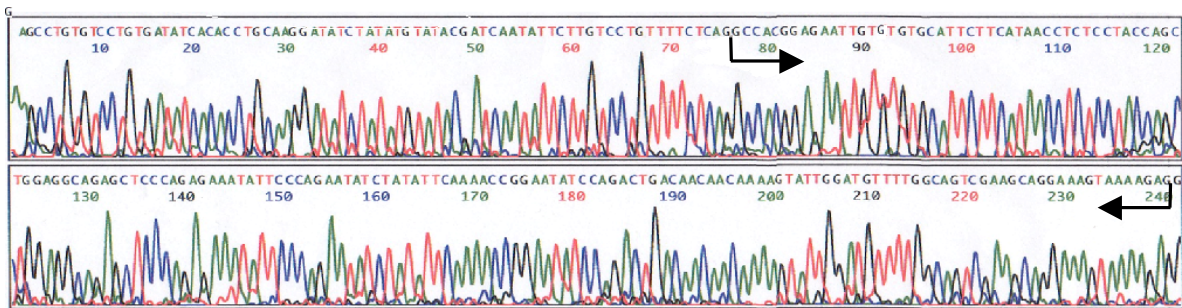
**Abb. 15** Patient II-3. Ausschnitt aus DNA-Sequenz von PKP2 Exon 6 sequenziert mit *forward-Primer*.



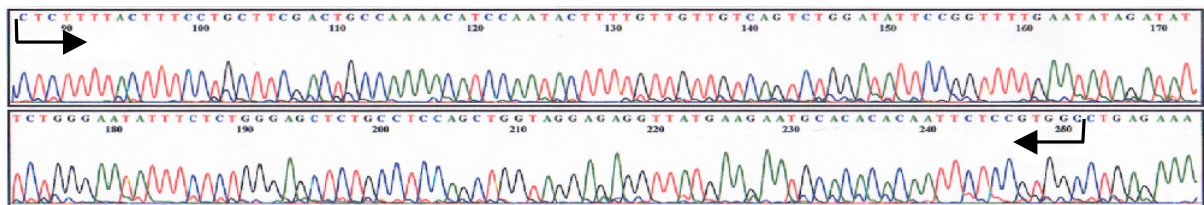
**Abb. 16** Patient II-3. Ausschnitt der DNA-Sequenz von PKP2 Exon 7 sequenziert mit *forward-Primer*.



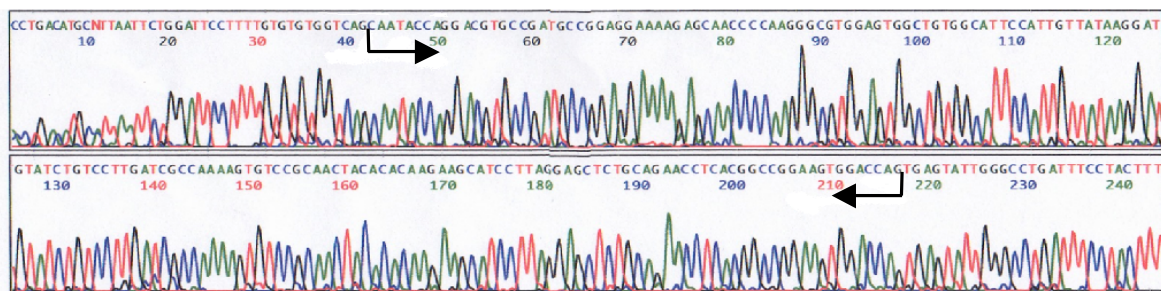
**Abb. 17** Patient II-3. Ausschnitt der DNA-Sequenz von PKP2 Exon 8 sequenziert mit *forward-Primer*.



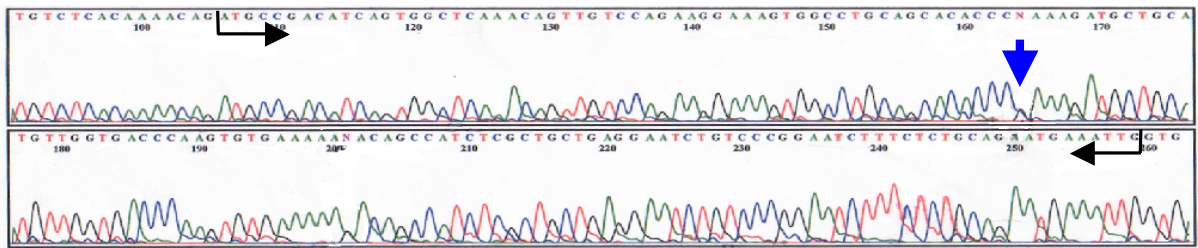
**Abb. 18** Patient II-3. Ausschnitt der DNA-Sequenz von PKP2 Exon 9 sequenziert mit *forward-Primer*.



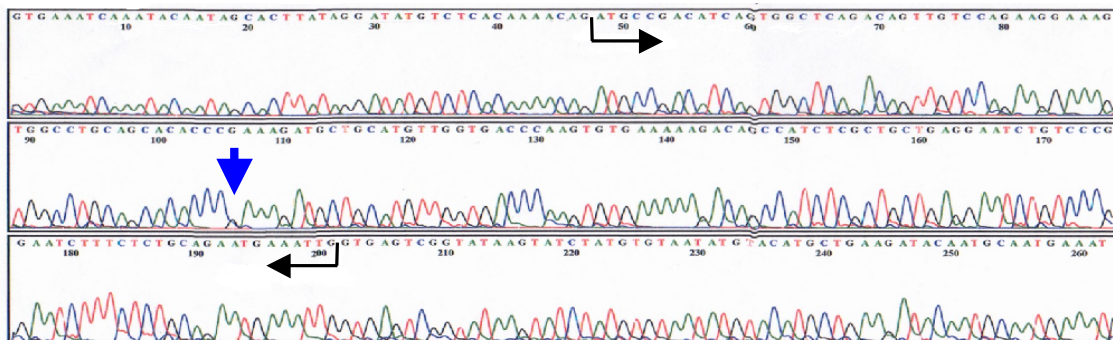
**Abb. 19** Patient II-2. Ausschnitt der DNA-Sequenz von PKP2 Exon 9 sequenziert mit *reverse-Primer*.



**Abb. 20** Patient II-3. Ausschnitt der DNA-Sequenz von PKP2 Exon 10 sequenziert mit *forward-Primer*.

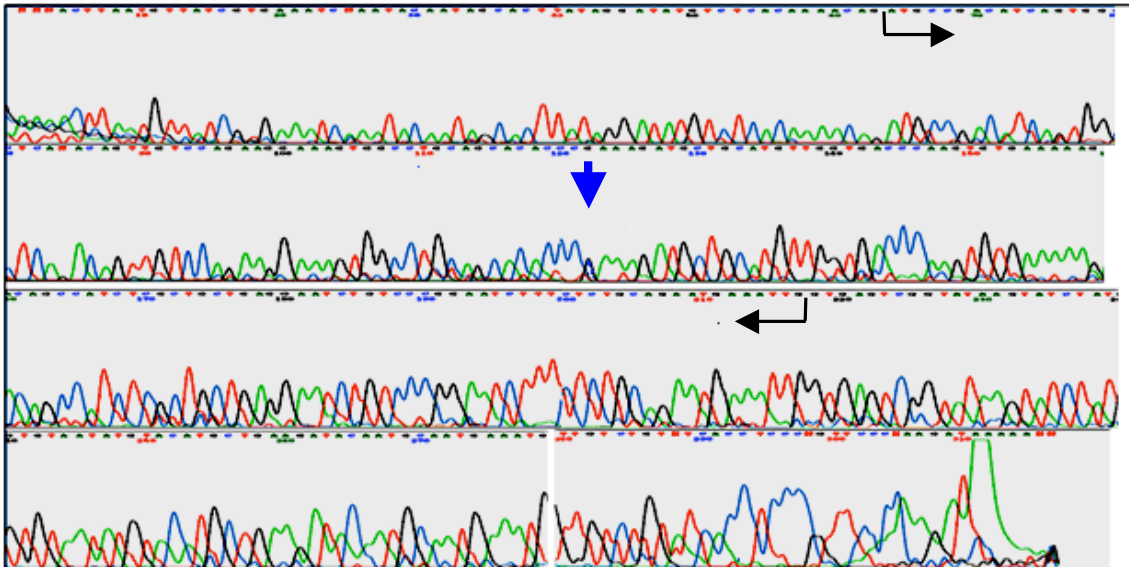


**Abb. 21** Patient II-2. Ausschnitt der DNA-Sequenz von PKP2 Exon 11 sequenziert mit *forward-Primer*. SNP bei blauem Pfeil, SNP mit einem Basenaustausch Guanin zu Cytosin, was eine Austausch der Aminosäure Arginin zu Prolin zur Folge hat. Allerdings fand sich der Einzenucleotidpolymorphismus auch in der Kontrolle mit gesunder DNA und in der genomischen Datenbank NCBI-SNP-Databse unter [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp\\_ref.cgi?rs=121434421\\_\\_Kontrolle](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=121434421__Kontrolle) mit DNA 5A, sowie Zwillingbruder II-3 s.u.

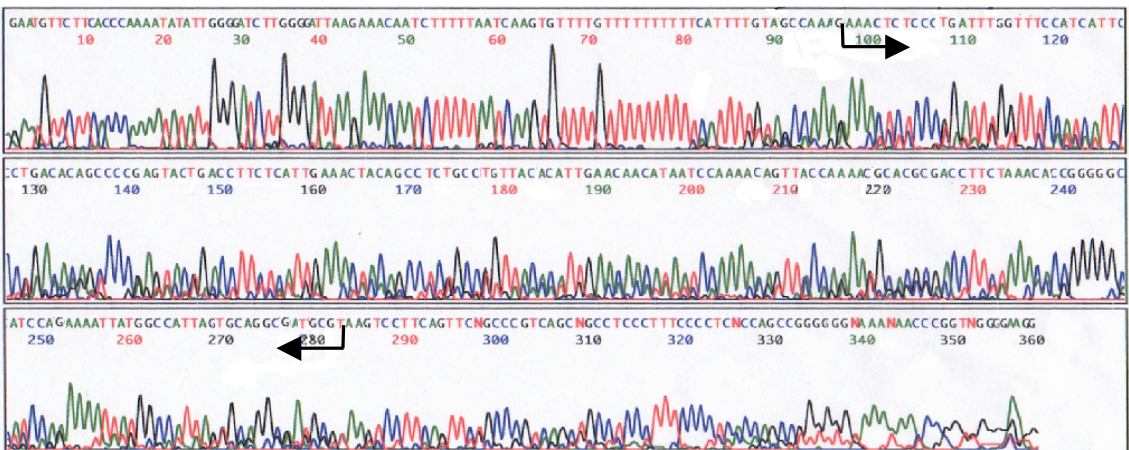


**Abb. 22** Patient II-3. Ausschnitt der DNA-Sequenz von PKP2 Exon 11 sequenziert mit *forward-Primer*.

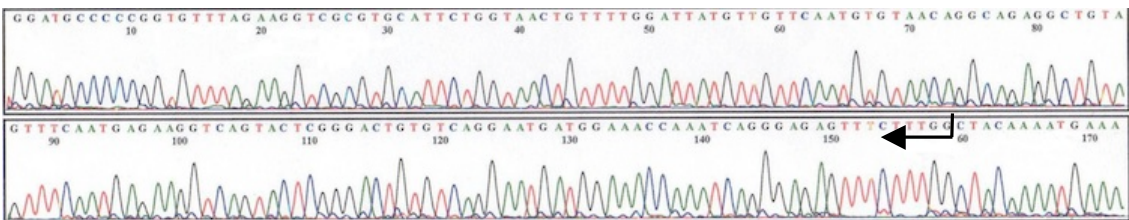




**Abb. 23** Ausschnitt der DNA-Sequenz von PKP2 Exon 11 sequenziert mit *forward-Primer* mit gesunder Kontroll-DNA 5A.

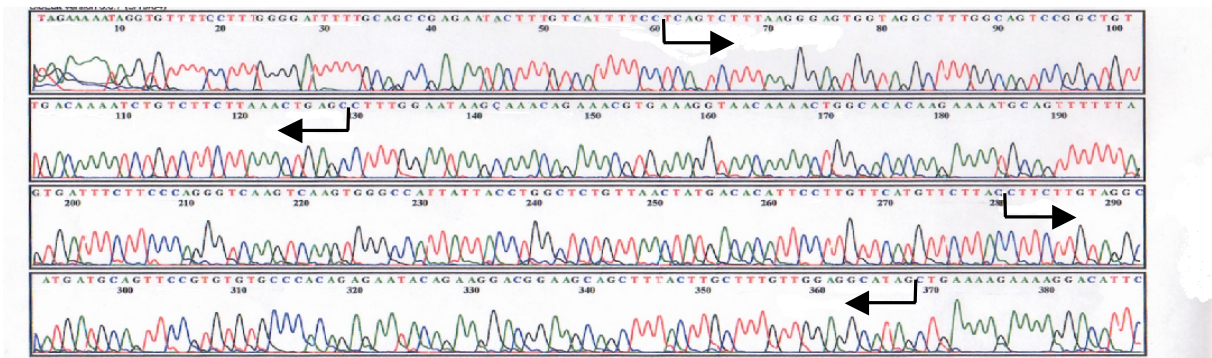


**Abb. 25** **Patient II-3.** Ausschnitt der DNA-Sequenz von PKP2 Exon 12 sequenziert mit *forward-Primer*.



**Abb. 26** **Patient II-3.** Ausschnitt der DNA-Sequenz von PKP2 Exon 12 sequenziert mit *reverse-Primer*.





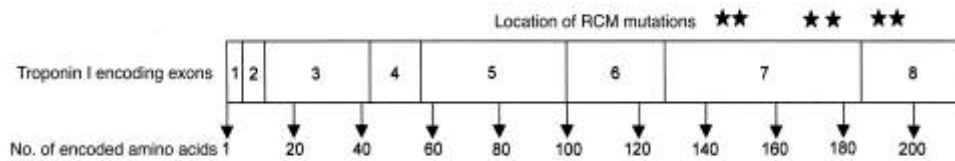
**Abb. 27** Patient II-3. Ausschnitt der DNA-Sequenz von PKP2 Exon 13 und 14 sequenziert mit *reverse-Primer*

Ausgehend von genomischer DNA wurden alle 14 proteincodierenden Exons des Plakophili2-Gens mittels PCR amplifiziert und direkt sequenziert. Zusätzlich zu den proteincodierenden Exons sequenzierten wir auch die 5'- und 3'- untranslatierten Regionen (utr). Bei Patient II-2 konnte in Exon 11, das mit *forward-Primer* amplifiziert wurde, ein Einzelnukleotidpolymorphismus identifiziert werden. Dieser SNP verursacht einen Basenaustausch von Guanin zu Cytosin, was wiederum einen Austausch der Aminosäure Arginin zu Prolin hat. Dieser Einzelnucleotidpolymorphismus bestätigte sich auch beim Bruder II-3, allerdings befand er sich auch in der Kontrolle mit gesunder DNA und in der genomischen Datenbank NCBI-SNP-Database ([http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp\\_ref.cgi?rs=121434421](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=121434421)) und konnte somit als nicht krankheitsrelevant gewertet werden. Auf den übrigen Exons 1 bis 10 und 12 konnten keine weiteren genomischen Polymorphismen gefunden werden.

### 3.2 Familie B

Auch die Familie B war für eine Kopplungsanalyse zu klein, so dass auch in diesem Fall ein Kandidatengen direkt sequenziert wurde, um mögliche pathogene Mutationen zu identifizieren. Die genetisch bedingte restriktive Kardiomyopathie kann verschiedene Ursachen haben. Sie tritt im Rahmen systemischer Erkrankungen als sekundäre RCM auf oder kann als primäre RCM durch genetische Faktoren verursacht sein. Da sowohl die HCM als auch die DCM durch Mutationen in kontraktilen Proteinen des Sarkomers verursacht werden können, lag es nahe auch Kopplungsanalysen bei RCM erkrankten Familien für diese Proteine durchzuführen, die das Troponin-I-Gen als wahrscheinlichstes Krankheitsgen ergaben, deshalb entschieden wir uns für Familie B das Troponin-I-Gen als Kandidatengen zu wählen. (Mogensen et al. 2003)

Das TnI-Gen liegt auf Chromosom 19, Location 19q13 und gliedert sich in 8 kodierende Exons. In Familie B wurden alle kodierenden Exons 1 bis 8 (s. Abb. 28) durch PCR mit genomischer DNA von der Patientin III-1, sowie Promotorregionen und untranslatierte Regionen (utr) amplifiziert. Die Primer wurden ebenfalls intronisch gewählt, ca. 50bp weit vom zu amplifizierenden Exon entfernt, um eventuelle Mutationen an Spleißstellen zu identifizieren und wurden mit Hilfe der Software *OLIGO (Version 4.0)* hergestellt. Bei ihrer Auswahl wurden eine Primerlänge von 18 - 25 bp und eine Schmelztemperatur um 60°C gewählt. Die Größe der PCR-Produkte sollte nicht länger als 600 bp sein, es sollten nicht mehr als vier gleiche Basen hintereinander vorkommen und keine Bildung von intramolekularen Haarnadelstrukturen entstehen. Die Sequenzierung der PCR-Produkte erfolgte wie in Kapitel 2.4 beschrieben.



**Abb. 28**      **Struktur des TNNI-Gens.** Schematische Darstellung des humane kardialen Troponin-I-Gens mit 8 codierenden Exons. Die Sterne markieren die bereits identifizierten 6 Mutationen bei Patienten mit restriktiver Kardiomyopathie. Abbildung modifiziert nach (Mogensen et al. 2003).

Exon	Sequenz	AT C°
1-3 forward	5'-CCT CGC CCT TTA TCT CAG TG-3'	59,4
1-3 reverse	5'-AGC ATG ACC CTC TGC AAA AC-3'	57,3
2 forward	5'-CCC CGA CCT CTT GTT CAG A-3'	59,5
2 reverse	5'-ACC CCA TCA CCA CCA AGA C-3'	59,5
3 forward	5'-GTG AGA GCA GCG GGC TAA G-3'	61,6
3 reverse	5'-CCT CTC TTC ACC CAA GAG TCC-3'	63,3
4 forward	5'-CCG TAG ACT CAG GGC TCA-3'	62,5
4 reverse	5'- AGCAC TTC CGC CCA CCT ACC-3'	60,7
5 forward	5'-AGG GTT TAG AAG GGC AGA GG-3'	60,5
5 reverse	5'-GAG CCA AGA CTC CAC AGA CC-3'	62,5
4+5 forward	5'-CTG GGG GTG TCT TGA GGT C-3'	61,0
4+5 reverse	5'-CGA GCA GAA GAG GGG ATA GA-3'	59,4
6+7 forward	5'-AGC CCC TTC TCC CTC AGA C-3'	61,0

6+7 reverse	5'-CTC CAA CTC CAA GCA CCA TC-3'	59,4
8 forward	5'-CTG GAC GGA AGA CAG GGA TT-3'	59,4
8 reverse	5'-CAT GGA GTC ACT TTC AGC TCA G-3'	60,3

**Tabelle 8 TNNI 3 Primertabelle DNA**

Exon	Sequenz	AT C°
68 forward	5'-CAT TCC CGG CCT GAG TCT-3'	58,4
68 reverse	5'-CTC AGT GGC CCT CCT CAG-3'	60,7
207 forward	5'-TAA GAT CTC CGC CTC GAG AA-3'	58,4
207 reverse	5'-AGG TCC AGG GAC TCC TTA GC-3'	62,5

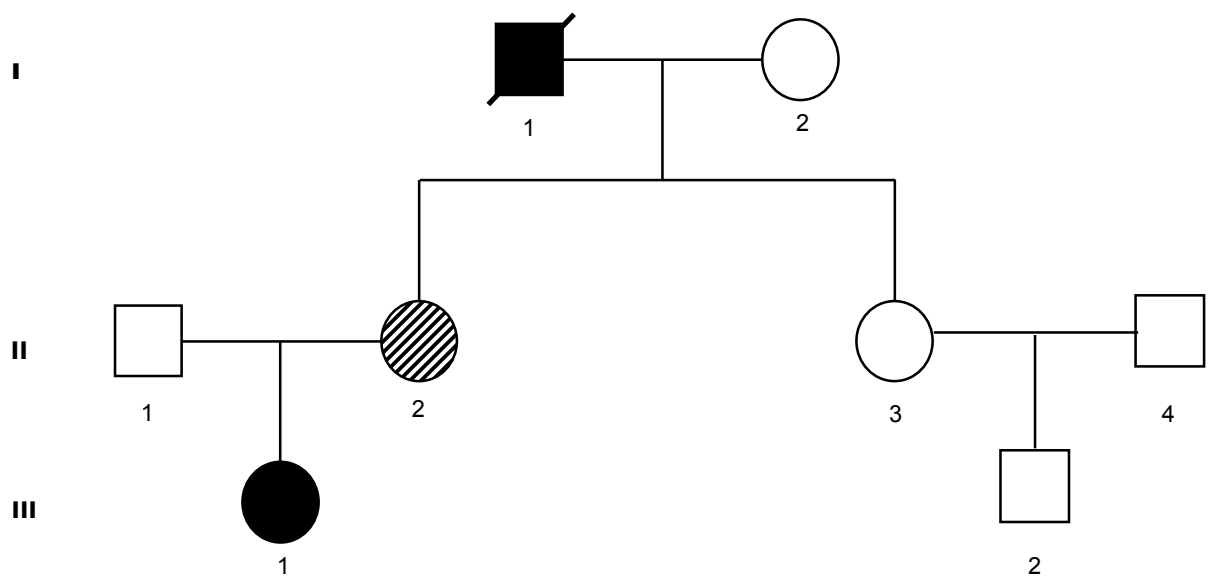
**Tabelle 9 TNNI 3 Primertabelle cDNA**

Exon	Sequenz	AT C°
Prom 864 forward	5'-GGA TGG ATT TCC CAG TGC TA-3'	58,4
Prom 864 reverse	5'-CTT GGG GCA TCA CTC ACC-3'	58,4
Prom 1633 forward	5'-AAT CAG CTC TGG GCA ACA CT-3'	58,4
Prom 1633 reverse	5'-AGA GTC TGC ACC CTC AGC TC-3'	62,5
Prom 2304 forward	5'-ACT TCC TGC CGC TCG ATT-3'	56,1
Prom 2304 reverse	5'-GAG AGT GAA CCT GGA GAC TCA GA-3'	64,6

**Tabelle 10 TNNI 3 Primertabelle Promotorregionen**

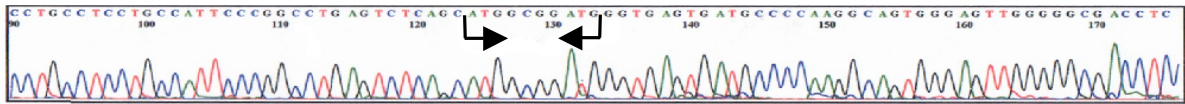
In Familie B zeigte die Tochter III-1 bereits im Alter von 19 Monaten Symptome einer restriktiven Kardiomyopathie bei noch normaler ventrikulärer Wanddicke. Ihre Mutter II-1 wies subjektiv keine Beschwerden auf (Marathonläuferin), zeigte aber auch in der Echokardiographie eine eingeschränkte Ventrikelfunktion, sie wurde aber nicht ausführlicher untersucht. Der Vater I-1 der Patientin II-1 verstarb mit 52 Jahren. Er war schon als Kind eingeschränkt körperlich belastbar und bereits im Alter von 29 Jahren litt er an Symptomen einer Bradyarrhythmia absoluta. Die Tante II-3 mütterlicherseits des kranken Kindes war bisher gesund, genauso wie der Vater II-2 des Kindes III-1. Weitere Familienmitglieder standen zur Untersuchung nicht zur Verfügung.

## Familie B

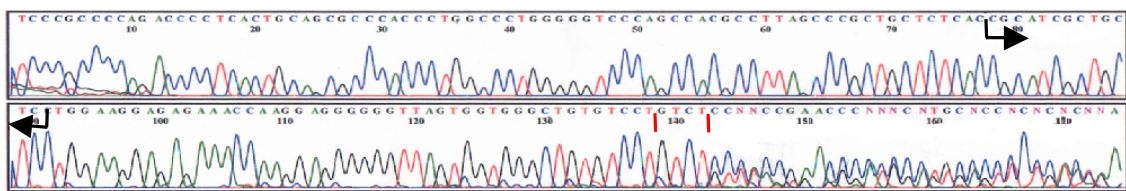


**Abb. 24** **Stammbaum der Familie B.** Schwarze Symbole repräsentieren betroffene, symptomatische Individuen, gestreifte Symbole betroffene, aber asymptomatische Patienten, leere Symbole markieren gesunde Personen, durchgestrichene Symbole zeigen bereits verstorbene Mitglieder.

Folgenden Abbildungen zeigen die DNA-Sequenzen von PKP2 Exon 1 bis 14. Die eckigen Pfeile  $\leftarrow \rightarrow$  begrenzen das jeweilige Exon.

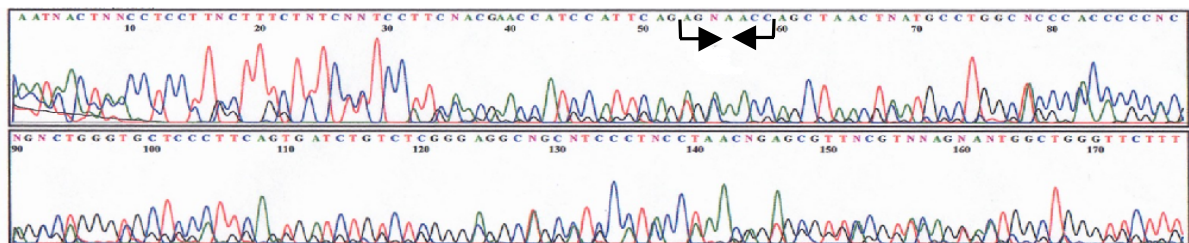


**Abb. 25** Patientin III-1. Ausschnitt der DNA-Sequenz von TNNI Exon 1 sequenziert mit *forward-Primer*.

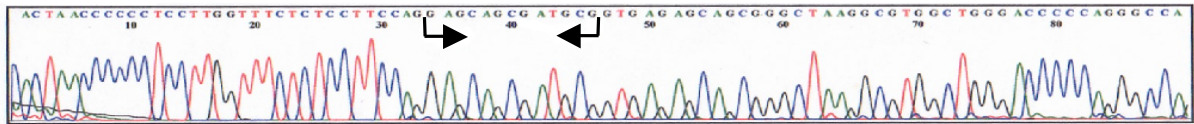


**Abb. 26** Patientin III-1. Ausschnitt der DNA-Sequenz von TNNI Exon 2 sequenziert mit *reverse-Primer*. 4 zusätzliche, intronisch gelegene Basen auf einem Strang. Markiert durch zwei rote Striche. Dadurch entsteht eine Insertion im nicht codierenden Bereich wie folgt: normal CCTAAGGGACCCC. Hierdurch 4 zusätzliche Basen: **GTCTCCTAAGGGACCCC**.

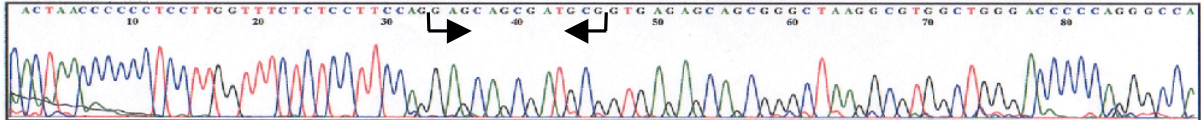
Es folgten die Sequenzierung dieses DNA-Abschnittes des gesunden Vater II-2 des Kindes III-1, der erkrankten Mutter II-1 und der Tante II-3 des Kindes III-1. Während die DNA-Sequenzen bei der Mutter II-1 und der Tante II-3 an dieser Stelle keine zusätzlichen Basen zeigten, war die Sequenz des gesunden Vaters II-2 ebenfalls auffällig



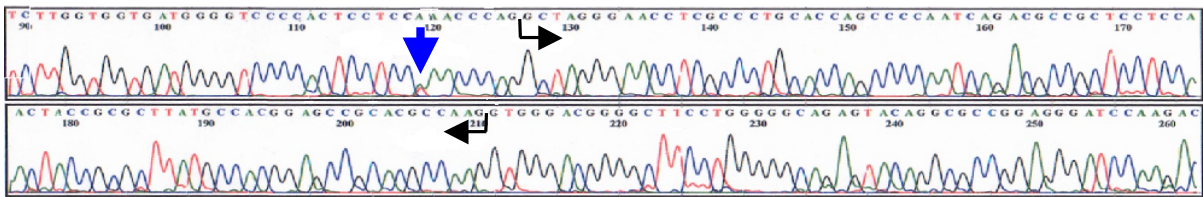
**Abb. 27** Patient II-2. Vater. DNA-Auschnitt von TNNI Exon 2 sequenziert mit *forward-Primer*.



**Abb. 28** Patientin II-1. Mutter. Ausschnitt der DNA-Sequenz von TNNI Exon 2 sequenziert mit *forward-Primer*.



**Abb. 29** Patientin II-3. Tante. Ausschnitt der DNA-Sequenz von TNNI Exon 2 sequenziert mit *forward-Primer*.



**Abb. 30** Patientin III-1. Ausschnitt der DNA-Sequenz von TNNI Exon 3 sequenziert mit *forward-Primer*. Mit einem blauen Pfeil markiert ist ein Single-nucleotide polymorphism (SNP), der in der genomischen Datenbank NCBI-SNP-Database bereits bekannt war und sich im Internet unter [www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp\\_ss.cgi?subsnp\\_id=4915767](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ss.cgi?subsnp_id=4915767) befindet.



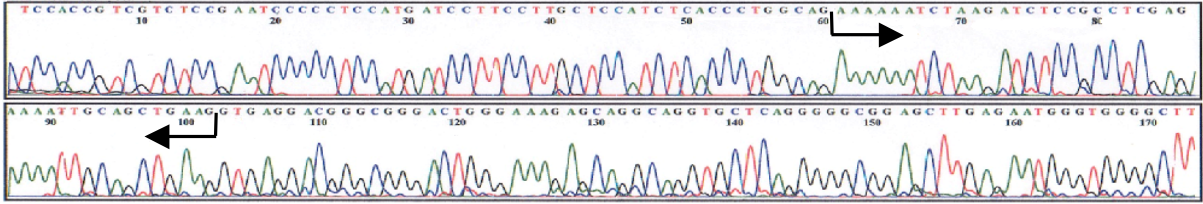


Abb. 31 Patientin III-1. DNA-Ausschnitt von TNNI Exon 4 sequenziert mit forward-Primer.

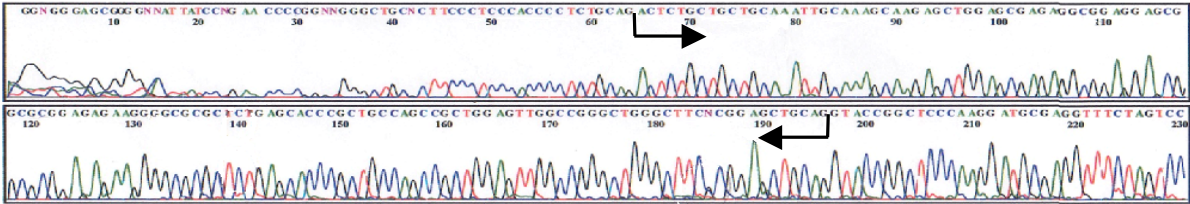


Abb. 32 Patientin III-1. Ausschnitt aus DNA-Sequenz von TNNI Exon 5 sequenziert mit forward-Primer.

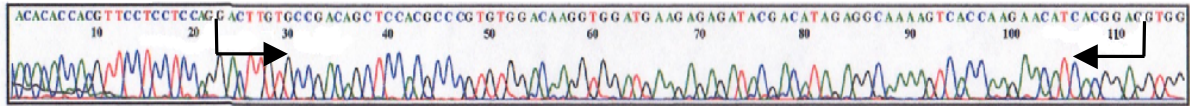


Abb. 33 Patientin III-1. DNA-Ausschnitt von TNNI Exon 6 sequenziert mit forward-Primer.

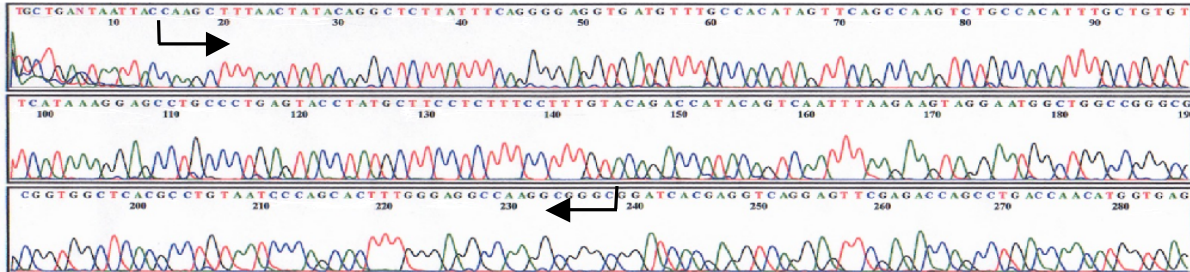
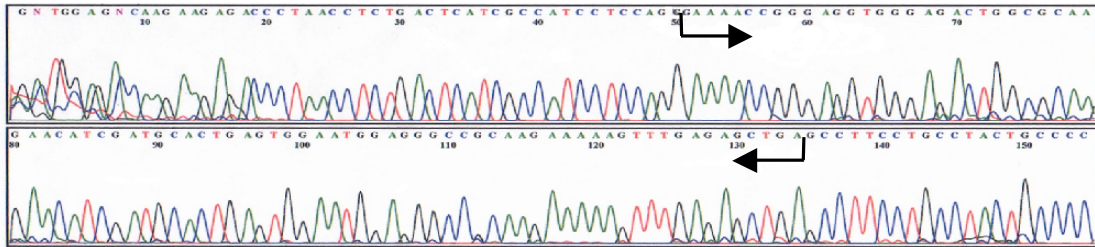


Abb. 34 Patientin III-1. TNNI Exon 7 sequenziert mit reverse-Primer.





**Abb. 35** Patientin III-1. Ausschnitt der DNA-Sequenz von TNNI Exon 8 sequenziert mit *forward-Primer*.

In Familie B wurden die proteinkodierenden Exons 1 bis 8, Promotorregionen und 5`- und 3`- untranslatierten Regionen (*utr*) durch PCR mit genomischer DNA der Patientin III-1 amplifiziert und anschließend sequenziert. Bei der Sequenzierung von Exon 2 wurden vier zusätzliche, intronisch gelegene Basen GTCT auf einem Strang entdeckt. Wir kontrollierten diese Insertion indem wir auch die DNA-Sequenz des gesunden Vaters II-2, der erkrankten Mutter II-1 und der Tante II-3 des Kindes III-1 untersuchten. Während der DNA-Abschnitt der Mutter II-1 und der Tante II-3 keine zusätzlichen Basen aufwiesen, war die Sequenz des Vaters II-2 an selber Stelle auffällig. Daraus konnten wir schließen, dass die vier zusätzlichen Basen vom gesunden Vater II-2 auf das Kind III-1 vererbt wurden und somit nicht mit der Krankheit korrelieren. Die weitere molekulargenetische Untersuchung der 8 Exons und intronischen Regionen ergab keine Hinweise auf RCM-verursachende Polymorphismen bei Familie B.

## 4 Diskussion

### 4.1 Sequenzierung des PKP-2-Gens der Familie A

Die arrhythmogene rechtsventrikuläre Kardiomyopathie ist eine eher seltene, erbliche Herzmuskelerkrankung, die insbesondere junge, ansonsten gesunde Menschen betrifft und mit einem erhöhten Risiko des plötzlichen Herztodes einhergeht und bevorzugt den rechten Ventrikel betrifft. (Corrado et al. 2009) Die Prävalenz wird sehr unterschiedlich beschrieben. Die pathologischen Charakteristika der ARVC sind eine Atrophie und fibrolipomatöse Umwandlung des myokardialen Gewebes, wodurch es zu einer lokalen Störung (Aneurysma oder Wandbewegungsstörung) kommt. 50% der symptomatischen Patienten besitzen eine Mutation in Bestandteilen der kardialen Desmosomen. Davon ist das Plakophilin-2-Gen das häufigste ARVC-verursachende Gen. (Awad et al. 2008; Thiene et al. 2007; Qiu et al. 2009)

Plakophilin 2 ist ein Bestandteil der kardialen Desmosomen und gehört zur Familie der Armadillo-Proteine, die bedeutende strukturelle und regulatorische Aufgaben bei der Interaktion von Proteinen in Desmosomen und Adhärenzverbindungen haben. (Perriard et al. 2003; Mertens et al. 1996) Alle Plakophiline (Plakophilin1, Plakophilin2 und Plakophilin3) bestehen aus einer N-terminalen Kopfdomäne, ca. 42 Aminosäure-Wiederholungen (*arm-repeats*) und einem C-terminalen Schwanzteil. Plakophilin2 ist am weitesten im Gewebe verbreitet, es findet sich in den Desmosomen aller Epithelien, sowie in nicht-epithelialen Geweben wie den Kardiomyocyten oder in Follikeln der Lymphknoten. In den kardialen Desmosomen verankert Plakophilin2 zusammen mit Plakoglobin und Desmoplakin die Desminintermediärfilamente mit den desmosomalen Cadherinen und sorgt so für die Aufrechterhaltung der strukturellen und funktionellen Stabilität des Herzmuskelgewebes. (Chen et al. 2002; Mertens et al. 1996)

Bisher wurden 9 ARVC-verursachende Genmutationen nachgewiesen, darunter desmosomale Mutationen des Plakoglobin-Gens JUP, des Desmoplakin-Gens DSP, des Desmoglein-2-Gens DSG2, des Desmocollin-2-Gens DCS2 und Mutationen nicht-desmosomaler Bestandteile wie im Ryanodin-Rezeptor-2 RYR2 und im Wachstumsfaktor  $\beta 3$  TGF $\beta 3$ . (Gerull et al. 2004; Pilichou et al. 2006; Syrris et al. 2006;

Beffagna et al. 2007) Basierend auf den Ergebnissen eines Knockout-Experiments in der Maus, bei denen es zu einem letal endenden Defekt in der kardialen Morphogenese kam, konnte angenommen werden, dass auch Mutationen im humanen PKP2 zur ARVC führen könnten. (Hatzfeld et al. 2006; Grossmann et al. 2005)

Der genaue Pathomechanismus, der zur Störung des kardialen Desmosomenaufbaus führt und die Rolle der PKP2-Mutationen bei Entstehung der ARVC sind bisher nicht genauer bekannt. Es wird vermutet, dass der Einbau von verändertem Plakophilin2 oder ein Mangel an Plakophilin2 die desmosomale Zell-zu-Zellverbindung schädigt und damit der Kontakt zur Nachbarzelle unterbrochen wird, besonders als Reaktion auf mechanischen Stress oder Dehnung. Der Verlust der Myocytenadhäsion führt zum Zelltod und regionalen Fibrosierung. Dieser fokale Schaden im rechten Ventrikel führt zur ARVC-typischen Arrhythmie. Es wird angenommen, dass Umweltfaktoren, wie Entzündungen durch virale Infektionen oder Belastung die Adhäsion verschlechtern und ein Fortschreiten der Erkrankung beschleunigen. (Lahtinen et al. 2007; Asimaki et al. 2007)

#### **4.1.1 Untersuchungen an Familie A**

Da Mutationen im PKP-2-Gen am häufigsten in den westlichen Ländern für die genetisch bedingte arrhythmogene rechtsventrikuläre Kardiomyopathie verantwortlich sind (van Tintelen et al. 2006), entschieden wir uns für das PKP-2-Gen als Kandidatengen für Familie A, die für eine Kopplungsanalyse zu klein war. So untersuchten z.B. Gerull et al. 120 nicht-verwandte Patienten, bei denen eine ARVC nach den Task Force Kriterien diagnostiziert worden war, indem direkt alle 14 Exons des PKP-2-Gens und flankierende Spleißsequenzen sequenziert wurden. Sie identifizierten 25 heterozygote Mutationen bei 32 der Probanden.

Es wurde die genomische DNA der eineiigen Zwillingsbrüder II-2 und II-3 untersucht, indem alle 14 Exons des PKP-2-Gens sequenziert wurden, sowie Promotorregionen und untranslatierte Regionen.

Bei Patient II-2 wurde auf Exon 11, das mit *forward-Primer* sequenziert wurde, ein Einzelnucleotidpolymorphismus SNP entdeckt. Dieser SNP verursachte einen

Basenaustausch von Guanin zu Cytosin, was wiederum einen Austausch der Amminosäure Arginin zu Prolin zur Folge hatte. Dieser Einzelnucleotidpolymorphismus bestätigte sich auch beim Bruder II-3, allerdings befand er sich auch in den Kontrollen mit gesunder DNA und in der genomischen Datenbank NCBI-SNP-Database. Somit konnte er als nicht krankheitsrelevant gewertet werden.

Da die Mehrzahl der ARVC-Mutationen im PKP2-Gen liegt (van Tintelen et al. 2006), scheint es durchaus sinnvoll dieses Gen bei betroffenen Personen direkt zu screenen. Bestätigt sich bei einem ARVC-Patienten tatsächlich eine PKP2-Mutation, sollte auch eine molekular genetische Analyse der Verwandten ersten Grades in Erwägung gezogen werden. Der entscheidende Vorteil der Genotypisierung von Familienmitgliedern ist weitere genetisch betroffene Personen frühzeitig in der präklinischen Phase zu identifizieren. (Corrado et al. 2009) Im Falle eines positiven genetischen Ergebnisses sollte eine genaue Familienanamnese erhoben und eine gründliche klinische Untersuchung durchgeführt werden (Schönberger et al. 2008), denn das Mutationsscreening kann nicht als alleiniges diagnostisches Mittel zur Diagnose ARVC dienen, sondern gilt nur als Ergänzung. Es kann eine präventive Therapie mit  $\beta$ -Blockern und/oder unter Berücksichtigung aller Risikofaktoren die Implantation eines Defibrillators vorgenommen werden. Dies sind äußerst effektive Maßnahmen in der Prävention des PHT. (Corrado et al. 2006) Des Weiteren gehört zu einer erfolgreichen Präventionsstrategie das Vermeiden von schwerer körperlicher Anstrengung oder die Ausübung von körperlich stark belastenden Sportarten, so wie ein engmaschiges klinisches Follow-up. (Corrado et al. 2009) Fällt das Testergebnis dahingegen negativ aus, müssen mögliche weitere Mutationen auf bekannten Krankheitsgenen ausgeschlossen werden.

Die Folgen eines positiven Testergebnisses müssen kritisch betrachtet werden, da ARVC-Mutationen eine geringe Penetranz und hohe Variabilität der phänotypischen Expression besitzen und der Patient verunsichert wird und einer enormen psychischen Belastung ausgesetzt wird. (Dalal et al. 2006)

Die Penetranz der ARVC ist altersabhängig und auch in höherem Alter inkomplett, im Mittel in den USA mit 26 Jahre und eine Spannweite von 2. bis 70. Lebensjahr. (Dalal et al. 2005) Es zeigten sich auch bei Dalal et al. Unterschiede zwischen den

Geschlechtern in der Penetranz der PKP-2-Mutationen. Für die geringere Penetranz beim weiblichen Geschlecht werden folgende Faktoren vermutet: Frauen sind seltener Triggern wie körperlich sehr anspruchsvollen Sportarten ausgesetzt; geschlechtsgekoppelte, genetische Faktoren, protektive hormonelle Faktoren (Dalal et al. 2006), wie der inhibitorische Effekt von Östrogen auf die Apoptose der kardialen Myocyten. In physiologischen Konzentrationen verhindert 17- $\beta$ -Estradiol den programmierten Zelltod der kardialen Myocyten, was sich im Falle einer ARVC günstig auf das Gewebe auswirken könnte, da die erkrankten Myocyten eine erhöhte Apoptoserate aufweisen. (Patten et al. 2004; Pelzer et al. 2000)

Die familiären Kardiomyopathien folgen den Mendel'schen Erbgängen, da sie von einer einzigen Genmutation verursacht werden. Allerdings können Mutationsträger mit identischen Mutation unterschiedlich stark ausgeprägte Krankheitsbilder zeigen, wie z.B. die eineiigen Zwillinge in Familie A oder 2 Zwillingspärchen in der Studie von Dalal et al. 2006. Während der Bruder II-2 an einer klinisch fortgeschrittenen ARVC erkrankt ist und einen implantierten Defibrillator (ICD) benötigt, weist sein Zwillingsbruder II-3 bisher noch keine klinischen Symptome auf, es zeigten sich aber in der Echokardiographie Fetteinlagerungen im Myokard und eine eingeschränkte Pumpfunktion des leicht vergrößerten rechten Ventrikels. Somit muss es noch weitere modifizierende Faktoren geben, die das Erscheinungsbild der Erkrankung beeinflussen und auch die breite Spannweite des Erkrankungsalters erklären könnten.

Die Sequenzierung der codierenden Exons und flankierenden Spleißregionen ergaben keine krankheitsrelevanten Mutationen, so dass bei Familie A davon ausgegangen werden muss, dass die genetische Mutation auf einem anderen ARVC-relevanten Gen liegen muss und dazu noch weitere molekulargenetische Untersuchungen nötig wären. So könnte z.B. das Plakoglobin- oder das Desmoplakin-Gen auf Mutationen untersucht werden, wobei hierzusätzlich zur ARVC eine cutane Beteiligung häufig ist, die bei den untersuchten Patienten fehlte.

## 4.2 Sequenzierung des TNNI3-Gens der Familie B

Die restriktive Kardiomyopathie ist eine sehr seltene Form der Herzmuskelerkrankungen. Sie ist durch eine verminderte diastolische Dehnbarkeit charakterisiert, die in einer eingeschränkten diastolischen Füllung und erhöhtem enddiastolischem Druck resultiert, während die systolische Ventrikelfunktion normal oder annähernd normal bleibt. Morphologisch zeigt sich eine meist normale Wanddicke und Ventrikelgröße. Sie wird symptomatisch durch Zeichen einer progressiven Herzinsuffizienz. Viele der Patienten versterben bereits bevor sie sich einer Herztransplantation unterziehen konnten. (Benotti et al. 1980) Verglichen mit der HCM und DCM besitzt die RCM die größte Morbiditäts- und Mortalitätsrate. (Artz et al. 2000) Die RCM kann im Rahmen systemischer Erkrankungen wie z.B. der Amyloidose, Sarkoidose oder M. Fabry als sekundäre RCM auftreten. Es können aber auch genetische Faktoren für eine RCM verantwortlich sein (primäre RCM). Die Ergebnisse molekulargenetischer Untersuchungen haben gezeigt, dass ein beachtlicher Anteil der idiopathischen restriktiven Kardiomyopathien durch Mutationen in sarkomeren Genen verursacht wird, die auch mit der HCM und der DCM assoziiert sind. (Mogensen et al. 2003; Kamisago et al. 2000; Geisterfer-Lowrance et al. 1990; Monserrat et al. 2007) Bisher wurden 6 Mutationen im kardialen Troponin I (cTnI) als verantwortlich für die RCM entdeckt. (Mogensen et al. 2003)

Troponin I gehört zusammen mit dem Troponin C TnC und Troponin T TnT zum kardialen Troponinkomplex, der mit Aktin und  $\alpha$ -Tropomyosin die dünnen Filamente der Herzmuskulatur bildet und für die Regulation der  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Kontraktion der Kardiomyocyten verantwortlich ist. Das Troponin I inhibiert in Abwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$  die Aktivität der Aktomyosin- $\text{Mg}^{2+}$ -ATPase. (Grabarek et al. 1992; da Silva et al. 1991; Ohtsuki et al. 1986; Zot et al. 1987) Im entspannten Zustand der Herzmuskelzelle blockiert die inhibitorische Domäne des TnI die Position von Aktin und Tropomyosin so, dass eine Interaktion zwischen Aktin und Myosin verhindert wird. Wird nun  $\text{Ca}^{2+}$  aus dem sarkoplasmatischen Reticulum freigesetzt, bindet es an TnC und erhöht somit die Affinität des TnC zur inhibitorischen Region des TnI, so dass sich dieses von Aktin und Tropomyosin löst und die Bindungsstelle für Myosin am Aktin frei wird und die Filamente aneinander vorbei gleiten können. (Farah et al. 1995)

Es konnte bewiesen werden, dass Mutationen im kardialen Troponinkomplex, Troponin I (cTnI), Troponin T (cTnT) und Troponin C (cTnC) häufig für Kardiomyopathien verantwortlich sind. Es zeigte sich, dass diese Mutationen die regulatorischen Eigenschaften des Troponinkomplexes verändern, indem die  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensitivität bei der Krafterzeugung zu- und abnimmt, was zur Entstehung der HCM und DCM führt. (Yanaga et al. 1999; Nakaura et al. 1999; Harada et al. 2000; Morimoto et al. 1998; Morimoto et al. 1999; Morimoto et al. 2002; Lu et al. 2003)

Bisher wurden sechs *Missense* Mutationen im humanen, kardialen Troponin I (cTnI) gefunden, welche die restriktive Kardiomyopathie RCM verursachen. Alle sechs RCM verursachenden Mutationen im cTnI befinden sich in hoch konservierten Regionen des TNNI3-Gens, und verändern daher vermutlich wichtige physiologische Funktionen des cTnI. Kopplungsanalysen, um Gene der sarkomeren, kontraktilen Protein zu untersuchen, ergaben das kardiale Troponin I (TNNI3) als wahrscheinlichstes Krankheitsgen. Die hohe Variabilität der phänotypischen Expression bei TNNI3-Mutationen lassen sich mit dem aktuellen Wissenstand über die funktionelle Bedeutung des kardialen Troponin I nicht erklären und lassen vermuten, dass weitere genetische Faktoren und Umwelteinflüsse die Krankheitsexpression mit beeinflussen. (Mogensen et al. 2003)

#### **4.2.1 Untersuchungen an Familie B**

Die Identifizierung von TNNI3-Mutationen bei einem Großteil der an idiopathischer RCM erkrankter Patienten ließ vermuten, dass zwischen Genveränderung und der Erkrankung ein Zusammenhang bestehen muss. Auch molekulargenetische Untersuchungen von weiteren RCM-Patienten bestätigten diese Vermutung. Kopplungsanalysen für Gene, die für sarkomere Proteine kodieren, identifizierten das TNNI3-Gen als wahrscheinlichstes Krankheitsgen. (Mogensen et al. 2003) Ziel einer Kopplungsanalyse ist es mit Hilfe polymorpher Mikrosatellitenmarker ein spezielles phänotypisches Merkmal (z.B. eine Krankheit) einem bestimmten Locus (chromosomalen Ort) zu zuordnen. Für alle Mitglieder eines großen Stammbaumes ist es möglich die Wahrscheinlichkeit  $L(\theta)$  zu berechnen, mit der ein Genotyp mit der Krankheit segregiert oder die Wahrscheinlichkeit  $L(0,5)$  zu berechnen, dass keine

Kopplung mit der Krankheit besteht. Das Verhältnis dieser Wahrscheinlichkeiten drückt die Chance einer Kopplung aus. der Quotient wird meist als Logarithmus angegeben und als LOD-Score bezeichnet (logarithm of the odds). Die Kopplungsanalyse für das zur Identifizierung des TNNI3-Gens ergab einen lod score von 4.8.

Daher wurde bei Familie B mit genetisch bedingter RCM das Troponin-I-Gen als Kandidatengen gewählt. Auch diese Familie besaß für eine Kopplungsanalyse nicht genügend zu untersuchende Mitglieder und einen nicht ausreichend charakterisierten Stammbaum. Die meist geringe Anzahl zur Verfügung stehender Familienmitglieder macht die Kopplungsanalyse für die Diagnostik im klinischen Alltag unbrauchbar und genetische Mutationen müssen durch direkte Sequenzierung identifiziert werden.

In Familie B wurden die kodierenden Exons 1 bis 8, Promotorregionen und untranslatierten Regionen (*utr*) durch PCR mit genomischer DNA der Patientin III-1 amplifiziert und anschließend sequenziert. Bei der Sequenzierung des Exon 2 wurden vier zusätzliche, intronisch gelegene Basen auf einem Strang entdeckt. Wir kontrollierten diese Auffälligkeit, indem wir auch die DNA-Sequenz des gesunden Vaters II-2, der erkrankten Mutter II-1 und der Tante II-3 des Kindes III-1 untersuchten. Während der DNA-Abschnitt der Mutter II-1 und der Tante II-3 keine zusätzlichen Basen aufwiesen, war die Sequenz des Vaters II-2 an selber Stelle auffällig. Daraus konnten wir schließen, dass die vier zusätzlichen Basen vom gesunden Vater II-2 auf das Kind III-1 vererbt wurden und somit nicht mit der Krankheit korrelieren. Die weitere molekulargenetische Untersuchung der 8 Exons und intronischen Regionen ergab keine Hinweise auf eine RCM-verursachende Mutation bei Familie B, so dass auch hier noch weitere Kandidatengene zur genetischen Untersuchung in Frage kommen.

Bei Patienten mit idiopathischer RCM muss an TNNI3-Mutationen gedacht werden und genau wie bei der ARVC ist es empfehlenswert Verwandte RCM-kranker Patienten klinisch und molekulargenetisch zu untersuchen, um frühzeitig Komplikationen der Erkrankung, vor allem den plötzlichen Herztod vermeiden zu können. (Mogensen et al. 2009)

Bis zur ersten Identifikation eines Krankheitsgens für HCM 1990, wurde angenommen, dass HCM, RCM und die erbliche Form der DCM unterschiedliche Entitäten sind



(Geisterfer-Lowrance et al. 1990; Seidman et al. 2001), inzwischen weiß man aber, dass alle drei Kardiomyopathieformen mit Mutationen des TNNI3-Gens assoziiert sein können. (Kamisago et al. 2000) Diese Erkenntnisse lassen vermuten, dass unterschiedliche Lokalisationen der Mutation auf dem sarkomeren Krankheitsgen zu verschiedenen Phänotypen führen können. (Mogensen et al. 1999; Chen et al. 1999)

Diese unterschiedlichen Expressionen der Phänotypen bei TNNI3 Mutationen lassen sich nicht mit dem aktuellen Wissensstand über TNNI erklären. Es ist stark anzunehmen, dass weitere genetische und Umweltfaktoren die Krankheitsexpression beeinflussen.

Die Charakterisierung der genetischen Ursachen von familiär bedingten Kardiomyopathien ergibt weitere Erkenntnisse der pathophysiologischen Mechanismen der Erkrankungen. Dies ist die Voraussetzung zur Entwicklung und Verbesserung von präventiven, diagnostischen und therapeutischen Maßnahmen.

## 5 Zusammenfassung

Die arrhythmogene rechtsventrikuläre Kardiomyopathie ARVC ist eine seltene Erkrankung des Herzmuskels. Die ARVC tritt oft familiär gehäuft auf und geht meist mit einer autosomal dominanten Vererbung einher. Durch molekulargenetische Untersuchungen konnten bisher neun Genmutationen identifiziert werden, davon ein Großteil in Bestandteilen der kardialen Desmosomen, am häufigsten im Plakophilin-2-Gen. Das Protein Plakophilin 2 ist Bestandteil kardialer Desmosomen und gehört zur Familie der Armadillo-Proteine. Es wird vermutet, dass Veränderungen im Protein Plakophilin 2 zu Schädigungen der Zell-Zell-Verbindungen führen. Der Verlust der Myocytenadhäsion führt zum Zelltod und regionalen Fibrosierung. Da Mutationen im PKP-2-Gen am häufigsten in den westlichen Ländern für die familiär auftretende ARVC verantwortlich sind, entschieden wir uns für das PKP-2-Gen als Kandidatengen für Familie A, die für ein signifikantes Ergebnis einer Kopplungsanalyse zu klein war. Bei der direkten Sequenzierung der 14 Exons des PKP2-Gens, konnte auf Exon 11 von Patient II-2 ein Einzelnucleotidpolymorphismus SNP identifiziert werden, der sich allerdings auch in gesunder Kontroll-DNA bestätigte und somit als nicht krankheitsrelevant gewertet werden konnte.

Die restriktive Kardiomyopathie RCM ist ebenfalls eine sehr seltene Herzmuskelerkrankung. Sie ist durch eine Verminderung der diastolischen Dehnbarkeit der Ventrikel charakterisiert. Die RCM kann im Rahmen systemischer Erkrankungen auftreten oder genetisch bedingt sein. Bisher wurden 6 Mutationen im kardialen Troponin-I-Gen als Ursache identifiziert. Troponin I gehört zusammen mit Troponin C und T zum kardialen Troponinkomplex und ist für die Regulation der  $Ca^{2+}$ -abhängigen Kontraktion der kardialen Myocyten verantwortlich. Kommt es zu Veränderungen im Troponin I, wird die physiologische Relaxation des myokardialen Gewebes gestört. Da Mutationen im TNNI3-Gen häufig an der Pathogenese der familiären RCM beteiligt sind, untersuchten wir bei Familie B das TNNI3-Gen durch Direktsequenzierung. Dabei wurden bei der Sequenzierung des Exon 2 des erkrankten Kindes III-1 vier zusätzliche, intronisch gelegene Basen auf einem Strang entdeckt, die zu einer Verschiebung des Leserasters führten. Die Kontrolle der Auffälligkeit durch die Sequenzierung des DNA-

Abschnitts bei der ebenfalls erkrankten Mutter II-1, der Tante II-3 und des gesunden Vaters II-2 zeigten, dass die vier zusätzlichen Basen vom gesunden Vater II-2 auf das Kind III-1 vererbt wurden und somit nicht mit der monogen vererbten Krankheit korrelieren. Die Charakterisierung der genetischen Ursachen von familiär bedingten Kardiomyopathien bringt weitere Erkenntnisse der pathophysiologischen Mechanismen der Erkrankungen. Dies ist die Voraussetzung zur Entwicklung und Verbesserung von präventiven, diagnostischen und therapeutischen Maßnahmen. Sollte sich bei Patienten, die an einer idiopathischen Kardiomyopathie erkrankt sind, eine genetische Ursache finden, so ist es für Verwandte empfehlenswert sich ebenfalls einer klinischen und genetischen Untersuchung zu unterziehen, um im Falle eines positiven Ergebnisses rechtzeitig Komplikationen der Erkrankung vermeiden und eine präventive Therapie einleiten zu können.

## 6 Literaturverzeichnis

1. Alberts B. Cells in their social context. Molecular Biology of the Cell, 2002.
2. Alberts B. The Cytoskeleton. The Molecular Biology of the Cell, 2002.
3. Antoniades Loizos TA. Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy caused by deletions in plakophilin-2 and plakoglobin (Naxos disease) in families from Greece and Cyprus: genotype-phenotype relations, diagnostic features and prognosis. Eur Heart J. 2006.
4. Artz G, Wynne J. Restrictive Cardiomyopathy. Curr Treat Options Cardiovasc Med. 2000 Oct;2(5):431-8.
5. Asimaki A, Syrris P, Wichter T, Matthias P, Saffitz JE, McKenna WJ. A novel dominant mutation in plakoglobin causes arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. Am J Hum Genet. 2007 Nov;81(5):964-73.
6. Awad MM, Calkins H, Judge DP. Mechanisms of disease: molecular genetics of arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy. Nat Clin Pract Cardiovasc Med. 2008 May;5(5):258-67.
7. Baserga SJ, Benz EJ, Jr. Beta-globin nonsense mutation: deficient accumulation of mRNA occurs despite normal cytoplasmic stability. Proc Natl Acad Sci U S A. 1992 Apr 1;89(7):2935-9.
8. Basso C, Thiene G, Corrado D, Angelini A, Nava A, Valente M. Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. Dysplasia, dystrophy, or myocarditis? Circulation. 1996 Sep 1;94(5):983-91.
9. Basso C, Tsatsopoulou A, Thiene G, Anastasakis A, Valente M, Protonotarios N. "Petrified" right ventricle in long-standing naxos arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. Circulation. 2001 Dec 4;104(23):E132-3.
10. Beffagna G, De Bortoli M, Nava A, et al. Missense mutations in desmocollin-2 N-terminus, associated with arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy, affect intracellular localization of desmocollin-2 in vitro. BMC Med Genet. 2007;8:65.

11. Benotti JR, Grossman W, Cohn PF. Clinical profile of restrictive cardiomyopathy. *Circulation*. 1980 Jun;61(6):1206-12.
12. Bonne S, van Hengel J, Nollet F, Kools P, van Roy F. Plakophilin-3, a novel armadillo-like protein present in nuclei and desmosomes of epithelial cells. *J Cell Sci*. 1999 Jul;112 ( Pt 14):2265-76.
13. Boom Fvd. Einfluss kardiomyopathie-bezogener Mutationen im humanen Herzmuskel-Troponin-T-Gen und der Bis-Phosphorylierung von humanem Herzmuskel-Troponin I auf die Flexibilität und die regulatorischen Eigenschaften rekonstituierter dünner Filamente 2003.
14. Chen X, Bonne S, Hatzfeld M, van Roy F, Green KJ. Protein binding and functional characterization of plakophilin 2. Evidence for its diverse roles in desmosomes and beta -catenin signaling. *J Biol Chem*. 2002 Mar 22;277(12):10512-22.
15. Corrado D, Basso C, Thiene G. Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy: an update. *Heart*. 2009 May;95(9):766-73.
16. D. LaVecchio LMM, R. Baumwart, M.C. Iazbik, N. Westendorf, C.G. Couto., Serum Cardiac Troponin I Concentration in Retired Racing Greyhounds. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. 2009;23(1):87-90.
17. da Silva AC, Reinach FC. Calcium binding induces conformational changes in muscle regulatory proteins. *Trends Biochem Sci*. 1991 Feb;16(2):53-7.
18. Dalal D, James C, Devanagondi R, et al. Penetrance of mutations in plakophilin-2 among families with arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol*. 2006 Oct 3;48(7):1416-24.
19. Farah CS, Reinach FC. The troponin complex and regulation of muscle contraction. *FASEB J*. 1995 Jun;9(9):755-67.
20. Fatkin D, Graham RM. Molecular mechanisms of inherited cardiomyopathies. *Physiol Rev*. 2002 Oct;82(4):945-80.
21. Franke WW, Goldschmidt MD, Zimbelmann R, Mueller HM, Schiller DL, Cowin P. Molecular cloning and amino acid sequence of human plakoglobin, the

- common junctional plaque protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989 Jun;86(11):4027-31.
22. Geisterfer-Lowrance AA, Kass S, Tanigawa G, et al. A molecular basis for familial hypertrophic cardiomyopathy: a beta cardiac myosin heavy chain gene missense mutation. *Cell*. 1990 Sep 7;62(5):999-1006.
23. Gemayel C, Pelliccia A, Thompson PD. Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol*. 2001 Dec;38(7):1773-81.
24. Gerull B, Heuser A, Wichter T, et al. Mutations in the desmosomal protein plakophilin-2 are common in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Nat Genet*. 2004 Nov;36(11):1162-4.
25. Gerull F, Meares R, Stevenson J, Korner A, Newman L. The beneficial effect on family life in treating borderline personality. *Psychiatry*. 2008 Spring;71(1):59-70.
26. Gomes AV, Liang J, Potter JD. Mutations in human cardiac troponin I that are associated with restrictive cardiomyopathy affect basal ATPase activity and the calcium sensitivity of force development. *J Biol Chem*. 2005 Sep 2;280(35):30909-15.
27. Gomes AV, Potter JD. Molecular and cellular aspects of troponin cardiomyopathies. *Ann N Y Acad Sci*. 2004 May;1015:214-24.
28. Gordon AM, Regnier M, Homsher E. Skeletal and cardiac muscle contractile activation: tropomyosin "rocks and rolls". *News Physiol Sci*. 2001 Apr;16:49-55.
29. Grabarek Z, Tao T, Gergely J. Molecular mechanism of troponin-C function. *J Muscle Res Cell Motil*. 1992 Aug;13(4):383-93.
30. Grossmann KS. Bedeutung von Plakophilin 2 für die Bildung von Zellverbindungen zwischen Herzmuskelzellen und die Morphogenese des Herzens. 2005.
31. Grossmann KS, Grund C, Huelsken J, et al. Requirement of plakophilin 2 for heart morphogenesis and cardiac junction formation. *J Cell Biol*. 2004 Oct 11;167(1):149-60.

32. Harada K, Takahashi-Yanaga F, Minakami R, Morimoto S, Ohtsuki I. Functional consequences of the deletion mutation deltaGlu160 in human cardiac troponin T. *J Biochem.* 2000 Feb;127(2):263-8.
33. Hatzfeld M. The armadillo family of structural proteins. *Int Rev Cytol.* 1999;186:179-224.
34. Hatzfeld M. Plakophilins: Multifunctional proteins or just regulators of desmosomal adhesion? *Biochim Biophys Acta.* 2006.
35. Hatzfeld M, Haffner C, Schulze K, Vinzens U. The function of plakophilin 1 in desmosome assembly and actin filament organization. *J Cell Biol.* 2000 Apr 3;149(1):209-22.
36. Hatzfeld M, Nachtsheim C. Cloning and characterization of a new armadillo family member, p0071, associated with the junctional plaque: evidence for a subfamily of closely related proteins. *J Cell Sci.* 1996 Nov;109 ( Pt 11):2767-78.
37. Herold G. *Kardiomyopathien. Innere Medizin*, 2008.
38. Heuser A, Plovie ER, Ellinor PT, et al. Mutant desmocollin-2 causes arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Am J Hum Genet.* 2006 Dec;79(6):1081-8.
39. Huang XP, Du JF. Troponin I, cardiac diastolic dysfunction and restrictive cardiomyopathy. *Acta Pharmacol Sin.* 2004 Dec;25(12):1569-75.
40. Huxley AF, Niedergerke R. Structural changes in muscle during contraction; interference microscopy of living muscle fibres. *Nature.* 1954 May 22;173(4412):971-3.
41. Kamisago M, Sharma SD, DePalma SR, et al. Mutations in sarcomere protein genes as a cause of dilated cardiomyopathy. *N Engl J Med.* 2000 Dec 7;343(23):1688-96.
42. Lahtinen AM, Lehtonen A, Kaartinen M, et al. Plakophilin-2 missense mutations in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Int J Cardiol.* 2008 May 7;126(1):92-100.

43. Lavecchio D, Marin LM, Baumwart R, Iazbik MC, Westendorf N, Couto CG. Serum cardiac troponin I concentration in retired racing greyhounds. *J Vet Intern Med.* 2009 Jan-Feb;23(1):87-90.
44. Lehrman MA, Schneider WJ, Brown MS, et al. The Lebanese allele at the low density lipoprotein receptor locus. Nonsense mutation produces truncated receptor that is retained in endoplasmic reticulum. *J Biol Chem.* 1987 Jan 5;262(1):401-10.
45. Lu QW, Morimoto S, Harada K, et al. Cardiac troponin T mutation R141W found in dilated cardiomyopathy stabilizes the troponin T-tropomyosin interaction and causes a Ca<sup>2+</sup> desensitization. *J Mol Cell Cardiol.* 2003 Dec;35(12):1421-7.
46. Luo Y, Leszyk J, Li B, Li Z, Gergely J, Tao T. Troponin-I interacts with the Met47 region of skeletal muscle actin. Implications for the mechanism of thin filament regulation by calcium. *J Mol Biol.* 2002 Feb 22;316(3):429-34.
47. Marcus FI, Fontaine GH, Guiraudon G, et al. Right ventricular dysplasia: a report of 24 adult cases. *Circulation.* 1982 Feb;65(2):384-98.
48. Maron BJ, Towbin JA, Thiene G, et al. Contemporary definitions and classification of the cardiomyopathies: an American Heart Association Scientific Statement from the Council on Clinical Cardiology, Heart Failure and Transplantation Committee; Quality of Care and Outcomes Research and Functional Genomics and Translational Biology Interdisciplinary Working Groups; and Council on Epidemiology and Prevention. *Circulation.* 2006 Apr 11;113(14):1807-16.
49. McKenna CJ. Arrhythmogenic right ventricular dysplasia, a cell adhesion cardiomyopathy: insights into disease pathogenesis from preliminary genotype-phenotype assessment. 1st Line 2006.
50. McKenna WJ, Thiene G, Nava A, et al. Diagnosis of arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy. Task Force of the Working Group Myocardial and Pericardial Disease of the European Society of Cardiology and of the Scientific Council on Cardiomyopathies of the International Society and Federation of Cardiology. *Br Heart J.* 1994 Mar;71(3):215-8.



51. McKoy G, Protonotarios N, Crosby A, et al. Identification of a deletion in plakoglobin in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy with palmoplantar keratoderma and woolly hair (Naxos disease). *Lancet*. 2000 Jun 17;355(9221):2119-24.
52. Mertens C. Plakophilin 2 : ein neues Cytoskelettprotein mit molekularen Interaktionen im Zellkern und in Zellverbindungen. [S.l.]: [s.n.]; 1999.
53. Mertens C, Hofmann I, Wang Z, et al. Nuclear particles containing RNA polymerase III complexes associated with the junctional plaque protein plakophilin 2. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Jul 3;98(14):7795-800.
54. Mertens C, Kuhn C, Franke WW. Plakophilins 2a and 2b: constitutive proteins of dual location in the karyoplasm and the desmosomal plaque. *J Cell Biol*. 1996 Nov;135(4):1009-25.
55. Mogensen J, Arbustini E. Restrictive cardiomyopathy. *Curr Opin Cardiol*. 2009 May;24(3):214-20.
56. Mogensen J, Klausen IC, Pedersen AK, et al. Alpha-cardiac actin is a novel disease gene in familial hypertrophic cardiomyopathy. *J Clin Invest*. 1999 May 15;103(10):R39-43.
57. Mogensen J, Kubo T, Duque M, et al. Idiopathic restrictive cardiomyopathy is part of the clinical expression of cardiac troponin I mutations. *J Clin Invest*. 2003 Jan;111(2):209-16.
58. Monserrat L, Hermida-Prieto M, Fernandez X, et al. Mutation in the alpha-cardiac actin gene associated with apical hypertrophic cardiomyopathy, left ventricular non-compaction, and septal defects. *Eur Heart J*. 2007 Aug;28(16):1953-61.
59. Moore DH, Ruska H. Electron microscope study of mammalian cardiac muscle cells. *J Biophys Biochem Cytol*. 1957 Mar 25;3(2):261-8.
60. Morimoto S. Sarcomeric proteins and inherited cardiomyopathies. *Cardiovasc Res*. 2008 Mar 1;77(4):659-66.
61. Morimoto S, Lu QW, Harada K, et al. Ca<sup>2+</sup>-desensitizing effect of a deletion mutation Delta K210 in cardiac troponin T that causes familial dilated cardiomyopathy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Jan 22;99(2):913-8.

62. Morimoto S, Nakaura H, Yanaga F, Ohtsuki I. Functional consequences of a carboxyl terminal missense mutation Arg278Cys in human cardiac troponin T. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999 Jul 22;261(1):79-82.
63. Muller J, Ritt DA, Copeland TD, Morrison DK. Functional analysis of C-TAK1 substrate binding and identification of PKP2 as a new C-TAK1 substrate. *EMBO J.* 2003 Sep 1;22(17):4431-42.
64. Nakaura H, Morimoto S, Yanaga F, et al. Functional changes in troponin T by a splice donor site mutation that causes hypertrophic cardiomyopathy. *Am J Physiol.* 1999 Aug;277(2 Pt 1):C225-32.
65. Nava A, Martini B, Thiene G, et al. [Arrhythmogenic right ventricular dysplasia. Study of a selected population]. *G Ital Cardiol.* 1988 Jan;18(1):2-9.
66. Norgett EE, Hatsell SJ, Carvajal-Huerta L, et al. Recessive mutation in desmoplakin disrupts desmoplakin-intermediate filament interactions and causes dilated cardiomyopathy, woolly hair and keratoderma. *Hum Mol Genet.* 2000 Nov 1;9(18):2761-6.
67. Ohtsuki I, Maruyama K, Ebashi S. Regulatory and cytoskeletal proteins of vertebrate skeletal muscle. *Adv Protein Chem.* 1986;38:1-67.
68. Patten M, Maas R, Bauer P, et al. Suppression of paroxysmal atrial tachyarrhythmias--results of the SOPAT trial. *Eur Heart J.* 2004 Aug;25(16):1395-404.
69. Patten RD, Pourati I, Aronovitz MJ, et al. 17beta-estradiol reduces cardiomyocyte apoptosis in vivo and in vitro via activation of phospho-inositide-3 kinase/Akt signaling. *Circ Res.* 2004 Oct 1;95(7):692-9.
70. Peifer M, Wieschaus E. The segment polarity gene armadillo encodes a functionally modular protein that is the Drosophila homolog of human plakoglobin. *Cell.* 1990 Dec 21;63(6):1167-76.
71. Pelzer T, Schumann M, Neumann M, et al. 17beta-estradiol prevents programmed cell death in cardiac myocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000 Feb 5;268(1):192-200.

72. Perriard J. Dilated cardiomyopathy: a disease of intercalated disk? *Trends Cardiovasc Med.* 2003.
73. Pilichou K, Nava A, Basso C, et al. Mutations in desmoglein-2 gene are associated with arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Circulation.* 2006 Mar 7;113(9):1171-9.
74. Protonotarios N, Tsatsopoulou A, Anastasakis A, et al. Genotype-phenotype assessment in autosomal recessive arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy (Naxos disease) caused by a deletion in plakoglobin. *J Am Coll Cardiol.* 2001 Nov 1;38(5):1477-84.
75. Qiu X, Liu W, Hu D, et al. Mutations of plakophilin-2 in Chinese with arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy. *Am J Cardiol.* 2009 May 15;103(10):1439-44.
76. Rampazzo A, Nava A, Danieli GA, et al. The gene for arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy maps to chromosome 14q23-q24. *Hum Mol Genet.* 1994 Jun;3(6):959-62.
77. Renz-Polster H. *Erkrankungen des Myokards. Basislehrbuch Innere Medizin,* 2004.
78. Renz-Polster H. *Anatomie und Physiologie des Herzens. Lehrbuch Innere Medizin,* 2004.
79. Reynolds AB, Herbert L, Cleveland JL, Berg ST, Gaut JR. p120, a novel substrate of protein tyrosine kinase receptors and of p60v-src, is related to cadherin-binding factors beta-catenin, plakoglobin and armadillo. *Oncogene.* 1992 Dec;7(12):2439-45.
80. Richardson P, McKenna W, Bristow M, et al. Report of the 1995 World Health Organization/International Society and Federation of Cardiology Task Force on the Definition and Classification of cardiomyopathies. *Circulation.* 1996 Mar 1;93(5):841-2.
81. Schönberger J, Kühler L, Martins E, Lindner TH, Silva-Cardoso J, Zimmer M. A novel locus for autosomal-dominant dilated cardiomyopathy maps to chromosome 7q22.3-31.1. *Hum Genet.* 2005 Dec;118(3-4):451-7.

82. Schönberger J, Seidman CE. Many roads lead to a broken heart: the genetics of dilated cardiomyopathy. *Am J Hum Genet.* 2001 Aug;69(2):249-60.
83. Seidman JG, Seidman C. The genetic basis for cardiomyopathy: from mutation identification to mechanistic paradigms. *Cell.* 2001 Feb 23;104(4):557-67.
84. Silbernagl Stefan KR. *Das Herz. Lehrbuch der Physiologie*, 2005.
85. Silbernagl Stefan KR. *Die Muskulatur. Lehrbuch der Physiologie*, 2005.
86. Syrris P, Ward D, Asimaki A, et al. Desmoglein-2 mutations in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy: a genotype-phenotype characterization of familial disease. *Eur Heart J.* 2007 Mar;28(5):581-8.
87. Syrris P, Ward D, Asimaki A, et al. Clinical expression of plakophilin-2 mutations in familial arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Circulation.* 2006 Jan 24;113(3):356-64.
88. Syrris P, Ward D, Evans A, et al. Arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy associated with mutations in the desmosomal gene desmocollin-2. *Am J Hum Genet.* 2006 Nov;79(5):978-84.
89. Takeda S, Yamashita A, Maeda K, Maeda Y. Structure of the core domain of human cardiac troponin in the Ca<sup>(2+)</sup>-saturated form. *Nature.* 2003 Jul 3;424(6944):35-41.
90. Thiene G, Corrado D, Basso C. Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy/dysplasia. *Orphanet J Rare Dis.* 2007;2:45.
91. Thiene G, Corrado D, Basso C. Revisiting definition and classification of cardiomyopathies in the era of molecular medicine. *Eur Heart J.* 2008 Jan;29(2):144-6.
92. van Tintelen JP, Entius MM, Bhuiyan ZA, et al. Plakophilin-2 mutations are the major determinant of familial arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy. *Circulation.* 2006 Apr 4;113(13):1650-8.
93. Welsch U. *Gewebe. Lehrbuch der Histologie*, 2002.
94. Yanaga F, Morimoto S, Ohtsuki I. Ca<sup>2+</sup> sensitization and potentiation of the maximum level of myofibrillar ATPase activity caused by mutations of troponin T

found in familial hypertrophic cardiomyopathy. *J Biol Chem.* 1999 Mar 26;274(13):8806-12.

95. Yumoto F, Lu QW, Morimoto S, et al. Drastic Ca<sup>2+</sup> sensitization of myofilament associated with a small structural change in troponin I in inherited restrictive cardiomyopathy. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005 Dec 23;338(3):1519-26.

96. Zhurinsky J. Plakoglobin and beta-catenin: protein interactions, regulation and biological role. *J Cell Sci.* 2000.

97. Zot AS, Potter JD. Structural aspects of troponin-tropomyosin regulation of skeletal muscle contraction. *Annu Rev Biophys Biophys Chem.* 1987;16:535-59.

## 7 Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1 aus (Moore et al. 1957) Elektronenmikroskopische Aufnahme einer ventrikulären Herzmuskelzelle im Längsschnitt. I = I-Bande (nur dünne Filamente), A = A-Bande (dicke und dünne Filamente), H = H-Bande, Z = Z-Bande, er = endoplasmatisches Retikulum, l = Lipidkörperchen..... 7
- Abb. 2 Die Familie der Armadillo-Proteine sind Adhäsions- und Signalmoleküle. Diese Proteinfamilie besteht aus drei Unterfamilien. Zur Unterfamilie der klassischen Catenine gehören  $\beta$ -Catenin und Plakoglobin. Die Plakophiline 1-3 bilden eine zweite Unterfamilie und besitzen neben neun Arm-Wiederholungen eine konservierte Sequenz im N-Terminus (Head-Domäne). Die p120-verwandten Proteine bilden die dritte Unterfamilie mit p0071, p120catenin und ARVCF, sie haben zusätzlich zu zehn (Arm)adillo-Wiederholungen eine Coiled-coil-Domäne in ihrem N-Terminus. Abb. entnommen aus (Grossmann et al. 2005)..... 10
- Abb. 3 Das dünne Filament besteht aus  $\alpha$ -Aktin, dem Troponin-Komplex (Troponin T, I und C) und  $\alpha$ -Tropomyosin.  $\beta$ -MHC und die leichten Ketten des Myosins bilden das dicke Filament. Die Bindung des Myosinkopfes an  $\alpha$ -Aktin führt zur Konformationsänderung des Myosinmoleküls. Dadurch knickt der Kopf gelenkartig ab, zieht  $\alpha$ -Aktin mit sich, und die Filamente gleiten aneinander vorbei. Dies führt zur Verkürzung des Sarkomers. Entnommen aus (Seidman et al. 2001) 11
- Abb. 4 Aktivierung der Aktomyosin Interaktion im dünnen Filament durch  $\text{Ca}^{2+}$ . Bei  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindung an cTnC erfährt der cTn-Komplex eine Reihe von Konformationsänderungen, die darin resultieren, dass cTnI nicht länger die Tm-Position an der Außenseite des Aktinfilaments stabilisiert, sondern Tm nun eine Position weiter in der Furche des Aktinfilamentes einnehmen kann und die Myosinbindungsstelle für die Myosinbindung an Aktin frei wird. cTn, kardiales Troponin; Tm, Tropomyosin .Abb. entnommen aus (Boom et al. 2003)..... 13

Abb. 5	Schematische Darstellung des PCR-Zyklus. Abbildung entnommen aus (Alberts 2002).....	36
Abb. 6	1 kb DNA Marker: 10.000bp, 8000bp, 6000bp, 5000bp, 4000bp, 3500bp, 3000bp, 2500bp, 2000bp, 1500bp, 1000bp, 750bp, 500bp, 250bp .....	41
Abb. 7	Genomische Struktur von Plakophilin 2 mit ARVC assoziierten Mutationen. Das humane Gen für Plakophilin 2 hat 14 Exone, die Nummerierung der Nukleotide beginnt beim ATG und bezieht sich auf die Genbank-Zugriffsnummer X97675. Die Positionen der 25 gefundenen Mutationen in ARVC-Patienten sind anhand der genomischen Sequenz dargestellt. Nach (Gerull et al. 2004). .....	49
Abb. 8	Stammbaum der Familie A. Schwarze Symbole repräsentieren betroffene, symptomatische Individuen; gestreifte Symbole betroffene, aber asymptomatische Patienten; leere Symbole markieren gesunde oder nicht untersuchte Personen, durchgestrichene Symbole zeigen bereits verstorbene Mitglieder .....	50
Abb. 10	Patient II-3. Ausschnitt aus DNA-Sequenz von PKP2 Exon 1 sequenziert mit <i>forward-Primer</i> .....	51
Abb. 11	Patient II-2. Ausschnitt der DNA-Sequenz von PKP2 Exon 2 sequenziert mit <i>forward-Primer</i> .....	51
Abb. 12	Patient II-2. Ausschnitt der DNA-Sequenz von PKP2 Exon 3 mit <i>forward-Primer</i> sequenziert. Exon zu lang, 845 bp, deshalb reverse wiederholt.....	51
Abb. 13	Patient II-3. Ausschnitt der DNA-Sequenz von PKP2 Exon 3 sequenziert mit <i>reverse-Primer</i> . .....	52
Abb. 14	Patient II-2. Ausschnitt DNA-Sequenz von PKP2 Exon 4 mit <i>forward-Primer</i> . .....	52
Abb. 15	Patient II-2. Ausschnitt der DNA-Sequenz von PKP2 Exon 5 sequenziert mit <i>forward-Primer</i> . .....	52
Abb. 16	Patient II-3. Ausschnitt aus DNA-Sequenz von PKP2 Exon 6 sequenziert mit <i>forward-Primer</i> . .....	53
Abb. 17	Patient II-3. Ausschnitt der DNA-Sequenz von PKP2 Exon 7 sequenziert mit <i>forward-Primer</i> . .....	53

Abb. 18	Patient II-3. Ausschnitt der DNA-Sequenz von PKP2 Exon 8 sequenziert mit <i>forward-Primer</i> .	53
Abb. 19	Patient II-3. Ausschnitt der DNA-Sequenz von PKP2 Exon 9 sequenziert mit <i>forward-Primer</i> .	54
Abb. 20	Patient II-2. Ausschnitt der DNA-Sequenz von PKP2 Exon 9 sequenziert mit <i>reverse-Primer</i> .	54
Abb. 21	Patient II-3. Ausschnitt der DNA-Sequenz von PKP2 Exon 10 sequenziert mit <i>foward-Primer</i> .	54
Abb. 22	Patient II-2. Ausschnitt der DNA-Sequenz von PKP2 Exon 11 sequenziert mit <i>foward-Primer</i> . SNP bei blauem Pfeil, SNP mit einem Basenaustausch Guanin zu Cytosin, was eine Austausch der Aminosäure Arginin zu Prolin zur Folge hat. Allerdings fand sich der Einzenucleotidpolymorphismus auch in der Kontrolle mit gesunder DNA und in der genomischen Datenbank NCBI-SNP-Database unter <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=121434421">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=121434421</a> Kontrolle mit DNA 5A, sowie Zwillingbruder II-3 s.u.	55
Abb. 23	Patient II-3. Ausschnitt der DNA-Sequenz von PKP2 Exon 11 sequenziert mit <i>foward-Primer</i> .	55
Abb. 24	Ausschnitt der DNA-Sequenz von PKP2 Exon 11 sequenziert mit <i>foward-Primer</i> mit gesunder Kontroll-DNA 5A.	56
Abb. 28	Stammbaum der Familie B. Schwarze Symbole repräsentieren betroffene, gestreifte Symbole betroffene, aber asymptotische Patienten, leere Symbole markieren gesunde Personen, durchgestrichene Symbole zeigen bereits verstorbene Mitglieder.	61
Abb. 29	Patientin III-1. Ausschnitt der DNA-Sequenz von TNNI Exon 1 sequenziert mit <i>forward-Primer</i> .	62
Abb. 30	Patientin III-1. Ausschnitt der DNA-Sequenz von TNNI Exon 2 sequenziert mit <i>reverse-Primer</i> . 4 zusätzliche, intronisch gelegene Basen auf einem Strang. Markiert durch zwei rote Striche. Dadurch entsteht eine Insertion im nicht codierenden Bereich wie folgt: normal CCTAAGGGACCCC. Hierdurch 4 zusätzliche Basen: GTCTCCTAAGGGACCCC.	62



Abb. 31	Patient II-2. Vater. DNA-Ausschnitt von TNNI Exon 2 sequenziert mit <i>forward-Primer</i> .....	62
Abb. 32	Patientin II-1. Mutter. Ausschnitt der DNA-Sequenz von TNNI Exon 2 sequenziert mit <i>forward-Primer</i> .....	63
Abb. 33	Patientin II-3. Tante. Ausschnitt der DNA-Sequenz von TNNI Exon 2 sequenziert mit <i>forward-Primer</i> .....	63
Abb. 34	Patientin III-1. Ausschnitt der DNA-Sequenz von TNNI Exon 3 sequenziert mit <i>forward-Primer</i> . Mit einem blauen Pfeil markiert ist ein Single-nucleotide polymorphism (SNP), der in der genomischen Datenbank NCBI-SNP-Database bereits bekannt war und sich im Internet unter <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ss.cgi?subsnp_id=4915767">www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ss.cgi?subsnp_id=4915767</a> befindet... 63	63
Abb. 35	Patientin III-1. DNA-Ausschnitt von TNNI Exon 4 sequenziert mit <i>forward-Primer</i> .....	64
Abb. 36	Patientin III-1. Ausschnitt aus DNA-Sequenz von TNNI Exon 5 sequenziert mit <i>forward-Primer</i> .....	64
Abb. 37	Patientin III-1. DNA-Ausschnitt von TNNI Exon 6 sequenziert mit <i>forward-Primer</i> .....	64
Abb. 38	Patientin III-1. TNNI Exon 7 sequenziert mit <i>reverse-Primer</i> .....	64
Abb. 39	Patientin III-1. Ausschnitt der DNA-Sequenz von TNNI Exon 8 sequenziert mit <i>forward-Primer</i> .....	65

## 8 Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
ADP	Adenosindiphosphat
AHA	American Heart Association
ARVC/D	Arrhythmogene rechtsventrikuläre Kardiomyopathie/ Dysplasie
ATP	Adenosintriphosphat
AV-Knoten	Atrioventrikularknoten
C	Cytosin
Ca <sup>2+</sup>	Calciumionen
cM	Centi-Morgan
CM	Kardiomyopathie
DCM	Dilatative Kardiomyopathie
DD	Differentialdiagnose
ddNTP	didesoxy-Nukleosidtriphosphate
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	desoxy-Nukleosidtriphosphate
DSC2	Desmocollin 2
DSG2	Desmoglein 2
DSP	Desmoplakin
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EKG	Elektrokardiogramm
et al.	et alii
EtBr	Ethidiumbromid

EtOH	Ethanol
G	Guanin
GTC	Guanidinisothiocynat
HCM	Hypertrophe Kardiomyopathie
ICD	Implantierbarer Defibrillator
JUP	Plakoglobin-gen
kb	Kilobasen
KCl	Kaliumchlorid
kD	Kilodalton
LINE	long interspersed nuclear elements
LOD	Logarithms of the Odds
LV	linker Ventrikel
M	Molar
MB	Megabasen
mg	Milligramm
Mg <sup>2+</sup>	Magnesiumionen
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MYBP	Myosin-bindendes Protein C
MYH 7	Myosin-Schwerkette
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
OD	Optische Dichte
OMIM	Online Mendelian in Man
PBS	Phosphate-buffered Saline

PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PHT	Plötzlicher Herztod
P <sub>i</sub>	anorganisches Phosphat
PKP1	Plakophilin 1
PKP2	Plakophilin 2
PKP3	Plakophilin 3
RCM	Restriktive Kardiomyopathie
RFLP	Restriktionsfragment Längenpolymorphismus
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RV	rechter Ventrikel
RYR2	Ryanodin-Rezeptor-2
SAGE	Serial analysis of gene expression
SINE	short interspersed nuclear elements
SNP	Einzelnuclotidpolymorphismus
SO <sub>4</sub>	Sulfat
SR	Sarkoplasmatisches Reticulum
T	Thymin
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
Tak-1	Tyrosinkinase
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
TGFβ3	Wachstumsfaktor beta 3
T <sub>m</sub>	Schmelztemperatur
cTnC	kardiales Troponin C

cTnI	kardiales Troponin I
cTnT	kardiales Troponin T
TNNI3	Troponin-I-Gen Typ3
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
u. a.	unter anderem
utr	untranslatierte Regionen
w/v	weight/volume
z. B.	zum Beispiel

## **Danksagung**

Bei Prof. Dr. Michael Zimmer möchte ich mich für die Überlassung des interessanten Themas und die geduldige Unterstützung während der Arbeit herzlich bedanken.

Mein Dank gilt auch Herrn Dr. Leif Kühler für die gute Einführung in die experimentellen Methoden und die freundliche Betreuung im Labor.

Herrn Gunnar-Ingi Kristjansson möchte ich für seine Hilfsbereitschaft und seine herzliche Art, die für eine heitere Atmosphäre im Labor sorgte, danken.

Einen Dank auch an Herrn Dr. Jost Schönberger für die Rekrutierung der Patienten und an die Familienmitglieder, die ihr Blut für wissenschaftliche Zwecke gespendet haben und so diese Arbeit erst möglich machten.

Ein ganz besonderer Dank geht an Jörg und meine Familie, die mich während der letzten Jahre immer unterstützt haben.