

**Variabilität des Schweregrads bei
Familiärer Hypertropher Kardiomyopathie
Quantifizierung von Wildtyp und Mutante auf mRNA- und Proteinebene**

Vom Fachbereich Chemie der Universität Hannover

zur Erlangung des Grades

Doktor der Naturwissenschaften

Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation

von

Dipl.-Chem. Imke Schulte

geboren am 14.1.1971 in Bremerhaven

Hannover 2001

Referent: Professor Dr. Walter Müller

Korreferent: Professor Dr. Bernhard Brenner

Tag der Promotion: 11. Juli 2001

Tag der Veröffentlichung: Oktober 2001

Dirk
und
meinen Eltern

Zusammenfassung

In Muskelbiopsien von Patienten mit Familiärer Hypertropher Kardiomyopathie (FHC) sollte der Anteil mutierter β -MHC an der Gesamt- β -MHC ermittelt werden, und zwar sowohl auf Proteinebene als auch auf mRNA-Ebene. Ziel ist, zu prüfen, ob neben der Art der Mutation auch der Anteil an mutierter β -MHC den Schweregrad der Krankheit beeinflussen kann. Dies könnte besonders bei Familien mit der gleichen Mutation und bei Mitgliedern der gleichen Familie einen stark unterschiedlichen Krankheitsverlauf erklären.

Nier et al. hatten in Proben eines klinisch wenig betroffenen Patienten mit der Val 606 \rightarrow Met Mutation einen Anteil von nur 12 % mutierter β -MHC gefunden. Die Bestimmung der Verhältnisse auf mRNA-Ebene im Rahmen dieser Arbeit ergab einen Anteil von 28 % (+/- 2,7 % sd) mutierter β -MHC mRNA.

Mit der gleichen Methode konnte ein weiterer klinisch wenig betroffener Patient mit der Gly 584 \rightarrow Arg Mutation untersucht werden. Ergebnis: Nur 20 % (+/- 0,6 % sd) der β -MHC im Filament sind mutiert. Da keine nativen Proben vorhanden waren, konnte das mRNA-Verhältnis nicht bestimmt werden.

Nach Anpassung der Methode konnte bei einem stark betroffenen Patienten mit der Arg 719 \rightarrow Trp Mutation der Gehalt an mutierter β -MHC als 40 % (+/- 24 % sd) ermittelt werden. Der Anteil an mutierter β -MHC mRNA betrug 57 % (+/- 0,9 % sd).

Der Anteil an mutiertem Protein im kontraktilen System kann demnach über einen großen Bereich variieren und könnte somit zur Variabilität der klinischen Symptomatik beitragen.

Die Abweichung vom erwarteten 1:1-Verhältnis zwischen wildtyp und mutiertem Produkt konnte bereits auf mRNA-Ebene nachgewiesen werden. Möglicherweise verschiebt sich dieses Verhältnis auf der Ebene von Translation bzw. Inkorporation in den kontraktilen Apparat noch weiter zu Gunsten des wildtyp Proteins.

Als Ursache für die verschiedenen Anteile mutierter β -MHC auf mRNA- und Proteinebene müssen neben den genetischen noch andere Faktoren eine Rolle spielen. Es wäre vorstellbar, dass die Lebensbedingungen und der Gesundheitszustand eines Patienten, sowie die verschiedene Ausprägung bei zwei Patienten gleicher genetischer Anlage zur Heterogenität der Krankheit entscheidend beitragen, besonders zur Heterogenität von Patienten mit gleicher Mutation.

Abstract

The main issue of this thesis was the determination of the portion of mutant β -MHC in muscle biopsies of patients with familial hypertrophic cardiomyopathy (FHC), both at the protein and mRNA level. This will form the basis to examine a possible correlation between the clinical symptoms of FHC and the amount of mutant β -MHC incorporated into the contractile system. If such correlation exists, different amounts of mutant β -MHC, aside from the type of mutation, might explain the heterogeneity of FHC, especially if families with the same mutation and members of the same family show a strongly different progress of the disease.

In samples of a clinically unaffected patient with a Val 606 \rightarrow Met mutation in the β -MHC, Nier et. al previously found a portion of only 12 % of mutant β -MHC protein. For the mRNA level we now find a portion of 28 % (+/- 2,7 % sd) of mutant β -MHC mRNA.

With the same approach for quantification of mutant to wildtyp protein, another clinically unaffected patient with the Gly 584 \rightarrow Arg mutation has been examined. Only 20 % (+/- 0,6 % sd) of the β -MHC in the filaments were mutant protein. Because no native samples were available, the portion of mutant mRNA could not be determined.

After adaptation of the approach for quantification of mutant to wildtyp protein for the Arg 719 \rightarrow Trp mutation, the portion of mutant β -MHC of a severely affected patient with this mutation was found to be 40 % (+/- 24 % sd). The corresponding amount of mutant mRNA was 57 % (+/- 0,9 % sd).

This shows that the portion of mutant protein in the contractile system can vary over a quite large range, and thus, in principle, can contribute to the variability in clinical symptoms. The deviation from the 1:1 ratio of wildtyp to mutant product was already found at the mRNA level, and a further shift of this ratio towards the wildtyp protein at the protein level, i.e., at the level of translation or incorporation of the protein into myofilaments, cannot be ruled out.

In addition to the genetic background other factors might cause the different portions of mutant β -MHC and the variability of the phenotype. It is possible that living conditions and health status of the patient, as well as the different marks of the same genetic background of different patients contribute to the heterogeneity of the disease, especially to the heterogeneity found for patients with the same mutation.

Schlagwörter

β -Isoform der schweren Kette des Myosins, Familiäre Hypertrophe Kardiomyopathie, Quantifizierung

Keywords

β -Myosin heavy chain, Familial hypertrophic cardiomyopathy, quantification

Inhaltsverzeichnis

1	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	1
2	EINLEITUNG.....	3
2.1	FAMILIÄRE HYPERTROPHE KARDIOMYOPATHIE: KRANKHEITSBILD, URSACHEN UND AUSWIRKUNGEN DER MUTATIONEN	3
2.1.1	Das Krankheitsbild der FHC.....	3
2.1.2	Genetische Defekte bei FHC und Auswirkungen auf das Myosin.....	4
2.2	MOLEKULARE PATHOLOGIE VON FHC	8
2.2.1	Funktionsgewinnmutationen.....	9
2.2.2	Funktionsverlustmutationen	10
2.2.3	Haploinsuffizienz-Hypothese für FHC.....	10
2.2.4	Dominant-negative Effekte	11
2.2.5	Dominant-negative Effekte bei FHC.....	12
2.3	MAUSMODELLE FÜR FHC	13
2.4	ÜBERSICHT DER MÖGLICHEN FAKTOREN, DIE DEN SCHWEREGRAD VON FHC BEEINFLUSSEN	15
3	ZIELE UND HYPOTHESEN DER ARBEIT	18
4	MATERIAL UND METHODEN	23
4.1	VERSUCHSMATERIAL	23
4.1.1	Herkunft der Muskelbiopsien.....	23
4.1.2	Vorbehandlung der Muskelproben	23
4.1.3	Synthetische Peptide.....	24
4.1.4	Gebrauchsmaterialien	25
4.2	PROTEIN-QUANTIFIZIERUNG.....	26
4.2.1	Isolierung von Myosin.....	26
4.2.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese mit dem PhastSystem.....	26
4.2.3	Färbung von Proteinen in SDS-Gelen mit Coomassie Brilliant Blue.....	27
4.2.4	UV-Spektrometrische Vermessung der synthetischen Peptide.....	27
4.2.5	Verdau des Myosins mit der Endoproteinase Lys-C.....	27
4.2.6	Chromatographische Auftrennung des Myosinverdaus	28
4.2.7	Massenspektrometrie.....	31
4.2.8	LC/MS-Kopplung.....	33
4.3	MRNA-QUANTIFIZIERUNG.....	34
4.3.1	Isolierung von Total-RNA mit TRIzol Reagenz.....	34
4.3.2	Photometrische Reinheits- und Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	35
4.3.3	Auftrennung von Total-RNA im denaturierenden Agarosegel.....	35
4.3.4	Reverse Transkription der Total-RNA	35
4.3.5	Polymerasekettenreaktion (PCR)	37

4.3.6	<i>Restriktionsverdau der PCR-Produkte</i>	39
4.3.7	<i>Auftrennung von DNA mit Agarosegelelektrophorese</i>	39
4.3.8	<i>Densitometrische Auswertung der Agarosegele</i>	40
5	ERGEBNISSE	41
5.1	QUANTIFIZIERUNG DES ANTEILS MUTIERTER AN DER GESAMT- β -MHC.....	41
5.1.1	<i>Isolierung und Verdau des Myosins</i>	42
5.1.2	<i>Überprüfung der synthetischen Peptide als Vergleichssubstanzen</i>	44
5.1.3	<i>Bestimmung des Anteils mutierter an der Gesamt-β-MHC in Muskelfaserbündeln des Patienten H 2 mit der Gly 584 \rightarrow Arg Mutation</i>	45
5.1.4	<i>Bestimmung des Anteils mutierter an der Gesamt-β-MHC in Muskelfaserbündeln des Patienten H 13 mit der Arg 719 \rightarrow Trp Mutation</i>	54
5.1.5	<i>Kontrollversuch</i>	65
5.2	QUANTIFIZIERUNG AUF mRNA-EBENE.....	66
5.2.1	<i>Bestimmung des Anteils der mutierten an der Gesamt-β-MHC mRNA in Muskelbiopsien des Patienten H 13 mit Arg 719 \rightarrow Trp Mutation</i>	67
5.2.2	<i>Bestimmung des Anteils der mutierten an der Gesamt-β-MHC mRNA in Muskelbiopsien des Patienten H 5 mit der Val 606 \rightarrow Met Mutation</i>	70
5.2.3	<i>Fehlerbetrachtung</i>	75
6	DISKUSSION	78
6.1	ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE.....	78
6.2	DISKUSSION DER PROTEINCHEMISCHEN METHODE	78
6.2.1	<i>Auswahl der Methode</i>	78
6.2.2	<i>Myosinisolierung, Identifizierung und Quantifizierung und Kontrollversuche der proteinchemischen Methode</i>	79
6.2.3	<i>Vergleich der proteinchemischen Quantifizierung der Proben mit der Gly 584 \rightarrow Arg Mutation (Patient H 2) mit Proben mit der Arg 719 \rightarrow Trp Mutation (Patient H 13)</i>	84
6.3	DISKUSSION DER METHODE ZUR mRNA-QUANTIFIZIERUNG.....	86
6.3.1	<i>Extraktion von Total-RNA, reverse Transkription, PCR und Restriktionsverdau</i>	86
6.3.2	<i>Diskussion einer quantitativen PCR-Methode</i>	89
6.4	MECHANISMEN DER ABWEICHUNG VOM 1:1 VERHÄLTNIS DER DNA-EBENE WÄHREND DER GENEXPRESSION.....	90
6.4.1	<i>Transkriptionsebene</i>	91
6.4.2	<i>Translationsebene</i>	94
6.4.3	<i>Filamentebene</i>	95
6.5	MÖGLICHE MECHANISMEN, DIE ZU DEN ABWEICHUNGEN WÄHREND DER GENEXPRESSION FÜHREN BEIDEN PATIENTEN H 2 (GLY 584 \rightarrow ARG), H 5 (VAL 606 \rightarrow MET) UND H 13 (ARG 719 \rightarrow TRP).....	97
6.6	BEDEUTUNG DER ERGEBNISSE FÜR ERKLÄRUNGSVERSUCHE ZUR VARIABILITÄT VON FHC.....	100
6.6.1	<i>Hypothese der Arbeit</i>	100

6.6.2	<i>Einfluss genetischer und umweltbedingter Faktoren auf FHC</i>	103
6.6.3	<i>Fazit</i>	104
7	AUSBLICK	105
7.1	MÖGLICHE VERSUCHE ZUR ERFORSCHUNG DER URSACHEN VON FHC	105
7.2	MÖGLICHE VERSUCHE MIT TIERMODELLEN.....	106
7.3	MÖGLICHE THERAPIEANSÄTZE	108
8	LITERATURVERZEICHNIS	110
	VERÖFFENTLICHUNGEN	121
	EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG	122
	DANKSAGUNG	123

1 Abkürzungsverzeichnis

Å	Angström (10^{-10}m)
AEBSF	4-(2-Aminoethyl)benzensulfonylfluorid
Arg	Arginin
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaar
cDNA	komplementäre DNA
CE	Kapillarelektrophorese
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DTT	Dithiothreitol
EGTA	Bis-(aminoethyl)-glycoether-N,N,N',N'- tetraacetat
FHC	Familiäre Hypertrophe Kardiomyopathie
Gly	Glycin
Gln	Glutamin
HCM	Hypertrophe Kardiomyopathie
HEPES	[4-(2-Hydroxyethyl)-piperazino]- ethansulfonsäure
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (<i>high performance liquid chromatography</i>)
kDa	Kilodalton
Leu	Leucin
Met	Methionin
MHC	<i>myosin heavy chain</i>
mM	Millimolar

MOPS	Morpholinopropansulfonsäure
mRNA	<i>messenger</i> RNA
Mut	Mutante
nm	Nanometer
OD	Optische Dichte
RNA	Ribonukleinsäure
RP	Reversed-Phase (Umkehrphase)
RT	Raumtemperatur
sd	standard deviation, Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
TBE	<i>TRIS Borate EDTA</i>
TFA	Trifluoressigsäure
Thr	Threonin
TRICIN	N-[Tris-(hydroxymethyl)-methyl]-glycin
TRIS	Tris(hydroxymethyl-)aminomethan
Trp	Tryptophan
u	Einheit enzymatischer Aktivität (units)
UV	Ultraviolett
Val	Valin
Wt	Wildtyp

2 Einleitung

2.1 Familiäre Hypertrophe Kardiomyopathie:

Krankheitsbild, Ursachen und Auswirkungen der Mutationen

Familiäre Hypertrophe Kardiomyopathie (FHC; MIM # 192600) ist eine häufige Form der erblichen Kardiomyopathien und eine wesentliche Ursache von plötzlichem Tod bei jungen Erwachsenen. Die Häufigkeit der Krankheit wird als 1 von 500 in der allgemeinen Bevölkerung angenommen (Maron et al., 1995), wobei die wirkliche Häufigkeit aufgrund der verschiedenen Ausprägungen des Phänotyps schwierig festzustellen ist. Die Ursachen primärer Kardiomyopathien, zu denen auch die Familiäre Hypertrophe Kardiomyopathie gehört, werden im Gegensatz zu denen sekundärer Kardiomyopathien noch schlecht verstanden.

Kennzeichen von FHC ist meist eine linksseitige Hypertrophie des Ventrikels. Verursacht wird die Krankheit durch Mutationen in den Sarkomerenproteinen. Ihr Erbgang ist autosomal dominant. Auffällig ist eine genotypische und phänotypische Heterogenität von FHC: Unterschiedliche Mutationen führen zu unterschiedlich schweren Krankheitsverläufen. Doch auch gleiche Mutationen in verschiedenen Familien führen zu unterschiedlichen Phänotypen, und sogar innerhalb einer Familie mit der gleichen Mutation gibt es Unterschiede. Der Schwerpunkt dieser Arbeit liegt auf FHC-verursachenden Mutationen in den Kodons 584, 606 und 719 der β -Isoform der schweren Kette des Myosins (β -MHC).

2.1.1 Das Krankheitsbild der FHC

Das morphologische Kennzeichen der Familiären Hypertrophen Kardiomyopathie ist die Hypertrophie des linken und/oder rechten Ventrikels, wobei andere Herz- und Kreislaufkrankungen, die eine Hypertrophie verursachen können, fehlen. Die Hypertrophie entsteht durch zumeist ungleichmäßige Wandverdickung des Ventrikels, wobei auch das Septum betroffen sein kann. Bei der Ausprägung der Hypertrophie gibt es große Unterschiede zwischen verschiedenen Patienten, sogar innerhalb einer Familie (Maron et al., 1987).

Histologisch ist die Krankheit durch Hypertrophie und Fehlorganisation der Myocyten, Vernarbungen des Myocards und Abnormitäten der kleinen intramuralen Koronararterien

gekennzeichnet. Typischerweise ist bei FHC-Patienten das Volumen des linken Ventrikels normal oder verkleinert. Durch die Veränderungen des linken Ventrikels kommt es zu veränderten hämodynamischen Eigenschaften. Die häufigsten Symptome von FHC sind Brustschmerzen, Kurzatmigkeit, Erschöpfung und Bewusstseinsstörungen. Außerdem treten bei Anstrengung Beklemmungsgefühle auf. In letzter Konsequenz kann die Krankheit zum plötzlichen Herztod führen, der manchmal aber auch das erste Symptom von FHC sein kann. Es gibt keine direkte Korrelation zwischen bestimmten Symptomen und einem einzigen pathophysiologischen Mechanismus. Ebenso wenig können aufgrund der Symptome Aussagen über den Schweregrad oder den Verlauf der Krankheit gemacht werden. Die Vorhersage der Sterblichkeit ist schwierig, jedoch gehen dem plötzlichen Herztod meist Herzrhythmusstörungen voraus (Maron et al., 1987).

Eine Therapie muss individuell auf jeden Patienten zugeschnitten werden, da der Beitrag der pathophysiologischen Faktoren variieren kann. In der Praxis werden zunächst β -Blocker zur allgemeinen Erleichterung der grundlegenden Herzsymptome verordnet. Versagen diese, werden Calciumkanal-Blocker (u.a. Verapamil) verabreicht, die die Ausflussweg-Obstruktion reduzieren. Es gibt jedoch keine Belege, dass β -Blocker oder Verapamil Patienten mit FHC vor dem plötzlichen Herztod schützen (Wigle et al., 1995). Des Weiteren werden Disopyramide (gegen Arrhythmien), Amiodarone (gegen Tachyarrhythmien) und Diuretika verwendet (Maron et al., 1987). Zusätzlich zur medikamentösen Therapie wird versucht, den Patienten durch chirurgische Maßnahmen Erleichterung zu verschaffen (Spirito et al., 1997). Bei Hochrisiko-Patienten soll ein implantierter Defibrillator ventrikulären Tachykardien oder Kammerflimmern, den Ursachen des plötzlichen Herztods, vorbeugen (Maron et al., 2000).

Die Erforschung der genetischen Grundlagen von FHC hat noch nicht zu einer Kausaltherapie geführt, so dass die Möglichkeiten der Diagnostik die Therapiemöglichkeiten überholt haben (Watkins, 2000). Dies liegt wahrscheinlich daran, dass die Mechanismen, mit welchen die verschiedenen Mutationen die große Variabilität von FHC verursachen, noch relativ unbekannt sind.

2.1.2 Genetische Defekte bei FHC und Auswirkungen auf das Myosin

FHC wird in über 50 Prozent aller Fälle autosomal dominant vererbt (Maron et al., 1984) (Maron et al., 1987). Linkage-Analysen haben Hinweise gegeben, dass das FHC-verursachende Gen in der Region q1 des Chromosoms 14 liegt. Im Abschnitt 14q11-q13

auf Chromosom 14 befinden sich die Gene der schweren Ketten des Myosins, so dass diese für Kandidatengene gehalten wurden (Jarcho et al., 1989; Solomon et al., 1990). Inzwischen wurden eine Reihe von Punktmutationen in der β -Isoform der schweren Kette des Myosins gefunden (β -MHC) (al-Mahdawi et al., 1993; Epstein et al., 1992; Geisterfer-Lowrance et al., 1990; Marian et al., 1994; Marian et al., 1992; Watkins et al., 1992). Zusätzlich konnten in einer Reihe weiterer Sarkomerenproteine FHC-verursachende Mutationen entdeckt werden: in den regulatorischen und essentiellen leichten Ketten des Myosins (Poetter et al., 1996), in Troponin-T und I (Kimura et al., 1997), in α -Tropomyosin (Thierfelder et al., 1994) und in Myosin-bindendem-Protein-C (Bonne et al., 1995; Watkins et al., 1995).

Kardiales Myosin ist ein konventionelles Klasse II Myosin. Es besteht aus zwei schweren Ketten (MHC) und zwei Paaren von leichten Ketten, die als essentielle (MLC-1) und regulatorische (MLC-2) leichte Ketten bezeichnet werden. Das Molekulargewicht beträgt ungefähr 520 kDa. Die β -Isoform der schweren Kette des Myosins (β -MHC) ist die Hauptisoform des Myosins im menschlichen Ventrikel und in langsamen Skelettmuskelfasern.

Das Myosinmolekül ist asymmetrisch aufgebaut: Das Grundgerüst besteht aus zwei umeinander gewundenen Schwanzteilen der schweren Ketten, an deren einem Ende sich zwei globuläre Kopfdomänen befinden. Die leichten Ketten sind paarweise am Übergangsbereich zwischen Kopf- und Schwanzteil angelagert.

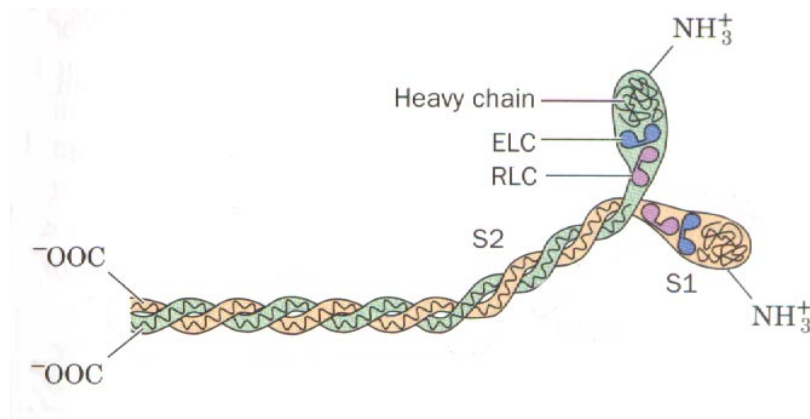


Abbildung 2.1 Aufbau des Myosinmoleküls.

Myosin ist ein hexamerer Molekül, bestehend aus zwei schweren (Heavy chain) und zwei Paaren von leichten Ketten (RLC und ELC). Es wird aus einem carboxyterminalen Schwanzteil und einem aminoterminalen, globulären Kopfteil gebildet. Der Schwanzteil aus zwei umeinander gewundenen α -Helices ist für die Filamentbildung notwendig. Der Kopfteil besitzt die Aktinbindungsstelle und das aktive Zentrum der ATPase-Funktion. Die leichten Ketten sind am Kopf-Hals-Übergangsbereich assoziiert (modifiziert nach (Voet and Voet, 1994)).

Der aminoterminaler, globulärer Teil des Moleküls ist birnenförmig und hat an der Stelle seiner größten Ausdehnung eine Höhe von 190 Angström und eine Weite von 50 Angström. Dieser Kopfteil ist die Motordomäne mit der ATP- und Aktinbindungsstelle. Der Halsbereich des Moleküls besteht aus einer 8,5 nm langen α -Helix, an die die leichten Ketten assoziiert sind. Der carboxyterminale Schwanzteil besitzt eine ungefähr 150 nm lange α -helikale *coiled-coil* Struktur und ist für die Ausbildung der Filamente verantwortlich (Rayment et al., 1993; Schiaffino and Reggiani, 1996). Das Zusammenwirken von Myosin- und Aktinfilamenten bildet die Grundlage der Muskelkontraktion.

Das Gen für die schwere Kette des kardialen Myosins (MYH7) befindet sich auf Chromosom 14 (Matsuoka et al., 1989) im Abschnitt 14q12 (Qin et al., 1990). Das MYH7 Gen ist 22 883 bp lang. Die 38 Exons der 6008 bp langen mRNA kodieren für ein 1935 Aminosäuren langes Protein (Jaenicke et al., 1990).

Es wird geschätzt, dass 40 bis 50 Prozent der FHC-Fälle auf Mutationen im Myosin zurückzuführen sind (McKenna, 1993). Es sind inzwischen über 50 Mutationen in nicht miteinander verwandten Familien gefunden worden (Bonne et al., 1998). Der überwiegende Teil der Träger ist heterozygot, es wurde jedoch von zwei Fällen mit homozygoten Trägern berichtet (Nishi et al., 1994; Richard et al., 2000). Bei wenigen

Patienten gibt es auch zwei Mutationen im MYH7-Gen (Jeschke et al., 1998; Nishi et al., 1995). Es wurden drei *hot spots* für Mutationen ausgemacht: die Kodons 403, 719 und 741. Alle bis auf drei der bisher bekannten Myosinmutationen sind Missense-Mutationen (Bonne et al., 1998). Der Großteil befindet sich in der Kopfdomäne und am Übergang von der Kopf- zur Schwanzdomäne des Moleküls (Arai et al., 1995; Kelly and Strauss, 1994). Hierbei gibt es eine Clusterung in vier Bereichen: in der Aktinbindungsstelle, an der Nukleotidbindungsstelle, in einem Bereich der zwei reaktive Cysteinreste verbindet und in der Nähe der Bindungsstelle der essentiellen leichten Kette (Bonne et al., 1998). Im Schwanzteil des Moleküls wurden bisher keine Mutationen gefunden. Wahrscheinlich würden sie die Zusammenlagerung zu Myosinfilamenten behindern, was letale Folgen hätte.

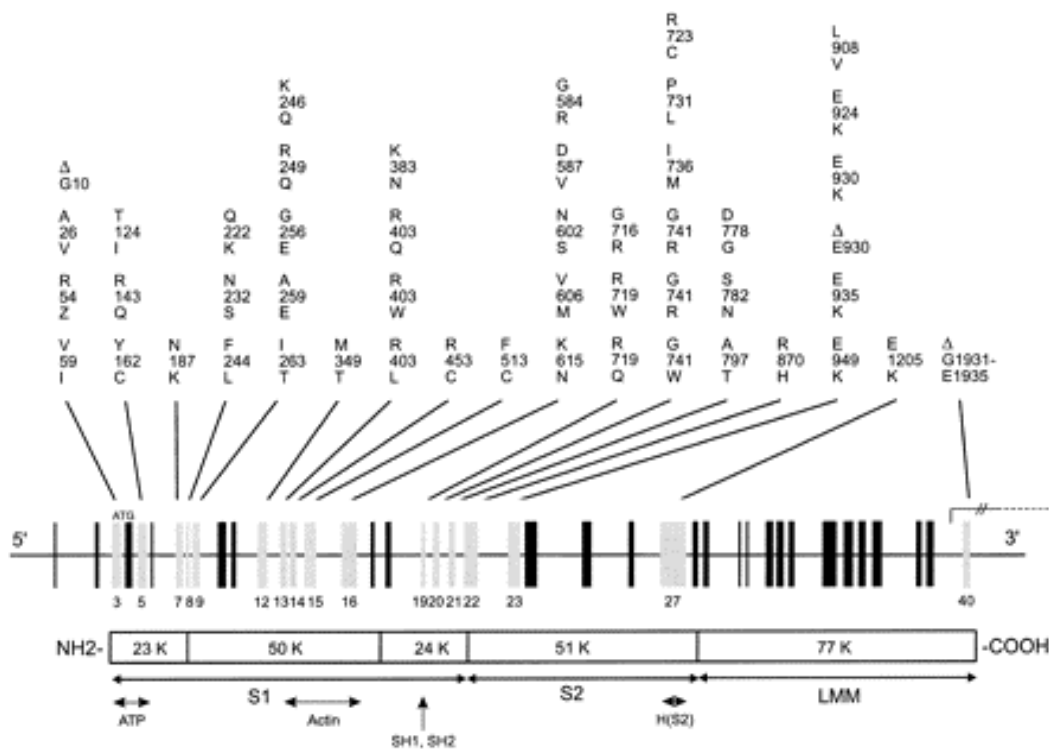


Abbildung 2.2 Schematische Darstellung des Gens MYH7 und der zugehörigen β-MHC.

Oben: genomische Struktur mit Stellen der Mutationen. Grau schraffiert und numeriert: Exons mit Mutationen. Unten: Proteinstruktur mit den Fragmenten S1, S2 und LMM. Funktionelle Regionen, wie ATP- und Aktin-Bindungsstellen, die aktiven Thiolreste SH1 und SH2 und die S2 hinge [H(S2)] sind gekennzeichnet (Bonne et al., 1998). Myosin kann tryptisch in zwei Teile, HMM (heavy meromyosin) und LMM (light meromyosin), gespalten werden. LMM bildet Filamente aus. Die zwei Subfragmente des HMM sind Subfragment 1 (S1) und 2 (S2), wovon S1 die Aktin-, ATP- und Leichte-Ketten-Bindungsstellen enthält.

2.2 Molekulare Pathologie von FHC

Es werden verschiedene Mechanismen diskutiert, wie die Mutationen zum beobachteten FHC-Krankheitsbild führen. In der Mehrzahl der Publikationen werden die Theorie des dominant negativen Effekts eines *poison polypeptides* und ein Haploinsuffizienz-Mechanismus favorisiert. Um darzustellen, aus welchem generellen Zusammenhang diese Theorien stammen, werden im Folgenden die Grundzüge der molekularen Pathologie vorgestellt. Dadurch wird auch deutlich, dass prinzipiell auch andere Erklärungsansätze für die Entstehung von FHC möglich sind. In den Abschnitten 2.2.3 und 2.2.5 werden die Theorien auf FHC übertragen.

Die molekulare Pathologie betrachtet die Auswirkung einer Mutation auf die Menge und Funktion eines Genprodukts und versucht zu erklären, warum eine Mutation für eine bestimmte Zelle oder während eines Entwicklungsstadiums pathogen ist. Grundsätzlich wird zwischen Funktionsverlust- und Funktionsgewinnmutationen unterschieden (Abbildung 2.3). Bei einer Funktionsverlustmutation besitzt das Genprodukt nur noch eine eingeschränkte oder überhaupt keine Funktion mehr. Zeichnet sich das Produkt durch eine anomale Funktion aus, wird sie als Funktionsgewinnmutation bezeichnet.

Funktionsverlustmutationen führen im Allgemeinen zu rezessiven Phänotypen, da der Organismus in den meisten Fällen auch mit der Hälfte eines Genprodukts lebensfähig ist. Reichen die 50 Prozent für eine normale Funktion nicht mehr aus, kann es zu dominanten Dosiseffekten kommen. Funktionsgewinnmutationen zeichnen sich dagegen durch einen dominanten Phänotyp aus, wobei es auch bei dieser Mutationsart zu Dosiseffekten kommen kann.

Zusätzlich wird als Auswirkung einer Punktmutation ein dominant negativer Effekt beobachtet, bei dem das Genprodukt nicht nur seine Funktion verliert, sondern das normale Genprodukt in seiner Funktion gleichzeitig beeinträchtigt. Dominant negative Effekte lassen sich besonders bei Dimeren oder Multimeren beobachten.

Veränderungen aufgrund einer Mutation können quantitativ und qualitativ sein. Dies bedeutet, dass sowohl die Menge als auch die abnormale Struktur eines Genprodukts eine pathogene Wirkung haben können. Eine veränderte Menge eines Genprodukts kann durch eine Punktmutation in der Kontrollsequenz, aber auch durch eine Mutation in der kodierenden Sequenz verursacht werden.

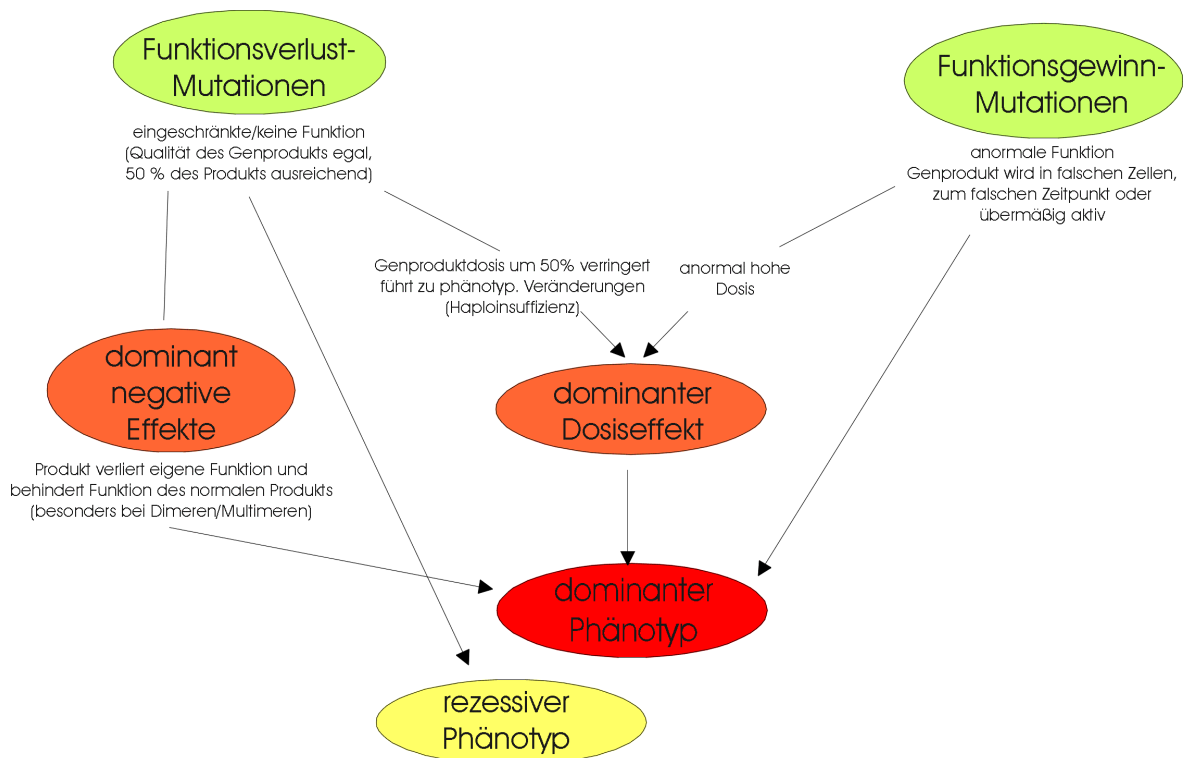


Abbildung 2.3 Übersicht zur molekularen Pathologie.

Mechanismen, wie Mutationen zu dominanten und rezessiven Phänotypen führen können.

Um die pathogene Wirkung einer Mutation zu bestimmen, müssen alle Schritte der Genexpression, von Translation bis Transkription, untersucht werden. Zusätzlich sollten noch strukturelle Veränderungen, wie die Stabilität der mRNA und des Proteins, sowie der Einbau des Proteins in ein Dimer oder Filament betrachtet werden.

Ein möglicher Erklärungsversuch, wie die Mutationen im Myosin FHC verursachen, muss in Einklang mit der dominanten Vererbung der Krankheit zu bringen sein. Im Folgenden werden daher nur pathogene Mechanismen, die zu einem dominanten Phänotyp führen, genauer beschrieben. Zudem liegt der Schwerpunkt auf Missense-Mutationen und kurzen Deletionen, die das Leseraster nicht verschieben, da diese die Hauptursachen von FHC sind (Strachan and Read, 1996; Wilkie, 1994)

2.2.1 Funktionsgewinnmutationen

Funktionsgewinnmutationen können durch verschiedene Mechanismen zu einem dominanten Phänotyp führen. Eine neue Funktion zeigte sich beispielsweise bei einer

Punktmutation im alpha 1-Antitrypsin. Sie führte dazu, dass das Protein ein neues Substrat erkannte: Statt Elastase wurde Thrombin inhibiert (Owen et al., 1983). Im Allgemeinen bedeutet eine Funktionsgewinn bei Erbkrankheiten, dass ein Gen während der falschen Entwicklungsphase, im falschen Gewebe oder aufgrund der falschen biochemischen Signale exprimiert wird oder, dass die Expressionsrate zu hoch ist. Von diesen Phänomenen käme als FHC-Ursache, nach momentanem Wissensstand, nur die Erhöhung der Expressionsrate eines Gens, z.B. von mutiertem oder wildtyp Myosin, in Frage. Es ist bis jetzt jedoch nicht beobachtet worden, dass die Erhöhung einer Expressionsrate durch eine Punktmutationen oder eine Deletionen hervorgerufen wurde (Wilkie, 1994). Aus diesem Grund wird hier nicht weiter auf Funktionsgewinnmutationen eingegangen.

2.2.2 Funktionsverlustmutationen

Eine Missense-Mutation führt mit hoher Wahrscheinlichkeit zu einem Funktionsverlust, wenn ein nichtkonservativer Aminosäureaustausch vorliegt, ein Proteinabschnitt mit wichtiger Funktion betroffen ist oder die Substitution eine Aminosäure betrifft, die bei vielen Spezies oder innerhalb einer Genfamilie konserviert ist. Genau diese Art von Missense-Mutationen sind mit FHC assoziiert. Obwohl Funktionsverlustmutationen normalerweise einen rezessiven Phänotyp erzeugen sollen, gibt es den Spezialfall der dominanten Funktionsverlustmutationen, die hier erläutert werden. Es handelt sich dabei um Mutationen, die dosisempfindliche Loci betreffen. Als dosisempfindlich bezeichnet man einen Locus, wenn die Verminderung der Genproduktmenge um 50 Prozent phänotypische Auswirkungen hat (Haploinsuffizienz), wie es bereits bei heterozygoten Mutationen der Fall sein kann. Bestimmte Funktionen von Genprodukten sind von sich heraus dosisempfindlich, wie zum Beispiel bei Proteinen, die miteinander in kooperative Wechselwirkungen treten, wobei das stöchiometrische Verhältnis eingehalten werden muss (Fisher and Scambler, 1994).

2.2.3 Haploinsuffizienz-Hypothese für FHC

Eine Haploinsuffizienz-Hypothese wurde modellhaft für Deletionsmutationen im Myosin aufgestellt, die zu einem FHC-ähnlichen Phänotyp führen: Das Auftreten einer Deletions-Mutation könnte ein Null-Allel erzeugen, was zu Haploinsuffizienz führen könnte: Da keine ausreichenden Mengen an normalem Protein mehr erzeugt werden, käme es zu einer unausgeglichene Stöchiometrie von dünnen und dicken Filamenten, wodurch Sarkomerenstruktur und -funktion beeinträchtigt würden. Hierdurch entstünde ein

dominanter Phänotyp. Dies geschieht in *Drosophila* bei Aktin- oder Myosin Null-Allelen. Sind die Fliegen heterozygot für Aktin- und Myosin Null-Allele, so dass die Filamentstöchiometrie erhalten bleibt, entstehen nahezu normale Myofibrillen (Beall et al., 1989).

In eine Mauslinie wurde ebenfalls ein Null-Allel für die α -Isoform der schweren Kette des Myosins (α -MHC) erzeugt. Die homozygoten Mäuse verstarben bereits *in utero* an schweren Herzdefekten, während die heterozygoten Mäuse lebensfähig waren. Es wurde allerdings insgesamt weniger Myosin transkribiert und translatiert, es kam zu Fibrose und veränderter Sarkomerenstruktur, sowie zu Herzfunktionsstörungen. Dies zeigt, dass zwei gesunde Allele mit daraus resultierender ausgeglichener Stöchiometrie der Sarkomerenproteine für die normale Herzentwicklung nötig sind, während ein einzelnes Allel zu Defiziten der Herzfunktion führt (Jones et al., 1996).

Die bisher über FHC beim Menschen erhobenen Daten, deuten nicht auf einen Haploinsuffizienz-Mechanismus hin (Bonne et al., 1998; Nishi et al., 1995). Diese Annahme ließe sich durch den Nachweis des mutierten Proteins direkt überprüfen: Bei einem Haploinsuffizienz-Mechanismus wäre die Abwesenheit von mutiertem Protein zu erwarten. In einigen FHC-Patienten konnte allerdings gezeigt werden, dass mutiertes β -MHC in den Muskelfilamenten vorhanden ist (Malinchik et al., 1997; Nier et al., 1999), so dass eine Haploinsuffizienz zumindest für diese Fälle ausgeschlossen werden kann.

2.2.4 Dominant-negative Effekte

Ein dominant-negativer Effekt tritt ein, wenn das mutierte Produkt nicht nur seine eigene Funktion verliert, sondern verhindert, dass das normale Genprodukt im heterozygoten Organismus seine Aufgabe erfüllt. Punktmutationen in den Genen für Kollagen Typ I, führen zu dominant negativen Effekten. Einige Mutationen in diesen Genen verhindern die Zusammenlagerung der Prokollagenketten zu Dreifachhelices und damit schließlich die Bildung von Kollagenfibrillen. Eine klinische Folge davon ist *Osteogenesis imperfecta* (Byers, 1990). Bei Tyrosinkinasen führen mutierte Proteine, die zusammen mit funktionsfähigen Molekülen Dimere bilden, zu einem inaktiven Produkt (Hemesath et al., 1994).

2.2.5 Dominant-negative Effekte bei FHC

Aufgrund des dominanten Erbganges wurde angenommen, dass das Allel, welches für mutierte β -MHC kodiert, auch exprimiert und das Genprodukt im kontraktilen Apparat inkorporiert wird. Entsprechend wurde mutiertes Protein auch im Gewebe gefunden, wo es auf dominante Weise, z.B. als *poison polypeptide* wirken könnte. Dieses müsste z.B. in das Sarkomer eingebaut werden und die Gesamtfunktion von wildtyp und mutiertem Protein und/oder die Zusammenlagerung der Filamente beeinträchtigen (Bonne et al., 1998; Kelly and Strauss, 1994; Sweeney et al., 1994).

Um diese Wirkung des mutierten Proteins zu analysieren, muss es zuerst möglich sein, dieses auch neben dem wildtyp Protein nachzuweisen. Dieses Vorhaben war für FHC bisher nur in zwei Fällen erfolgreich, da eine Punktmutation die physiko-chemischen Eigenschaften eines relativ großen Moleküls nur minimal ändert. Der Molekulargewichtsunterschied zwischen wildtyp und mutiertem Myosin ist für eine Auftrennung auf einem SDS-Gel nicht ausreichend. Spezifische Antikörper für beide Proteintypen herzustellen ist bis jetzt nicht gelungen und wegen ihrer großen Ähnlichkeit wahrscheinlich unmöglich. Deshalb mussten aufwendige Trennverfahren entwickelt werden:

In Skelettmuskelextrakten einer Patientenprobe mit der Arg 403 \rightarrow Gln Mutation konnte ein 1:1 Verhältnis von mutiertem zu wildtyp Myosin ermittelt werden. Die Mutation zerstörte die Schnittstelle einer Endoproteinase, so dass die verschieden großen Fragmente für wildtyp und mutiertes Protein in einem Western-Blot nachgewiesen und quantifiziert werden konnten (Malinchik et al., 1997).

In einer weiteren erfolgreichen Methode wurde ein spezifischer Endoproteinaseverdau für das Myosin benutzt, bei dem ungefähr 200 Peptide entstehen. Die Punktmutation veränderte die physiko-chemischen Eigenschaften der kleineren Fragmenten so, dass wildtyp und mutiertes Peptid mit einer Kombination von HPLC und CE nachweisbar und quantifizierbar waren (Nier et al., 1999). Da diese Methode für die vorliegende Arbeit von besonderer Bedeutung ist, geht Abschnitt 3.2 genauer darauf ein.

Eine weitere Voraussetzung einen dominant negativen Effekt einer Myosinmutation zu identifizieren, erfordert den Nachweis funktioneller Veränderungen des Gewebes. Einige Mutationen führen zu einer Erniedrigung der Filamenttranslokationsrate im *in vitro* Motilitätsassays und/oder zu verringerter Krafterzeugung, während bei anderen

Myosinmutationen auch erhöhte Translokationsgeschwindigkeiten und/oder erhöhte Kräfte gemessen wurden (Bonne et al., 1998). Beispielsweise wurde für humane Patientenbiopsien mit der Mutation Val 908 → Leu und Arg 403 → Gln eine ungewöhnlich langsame, aber für beide Mutationen gleiche Gleitgeschwindigkeit in *in vitro* Motilitätsassays gefunden. Es wurde diskutiert, dass durch die Mutation die Interaktion von Myosin und Aktin beeinträchtigt wurde. Diese verschlechterte Interaktion könnte dann im Herzen der Patienten eine kompensatorische Hypertrophie hervorrufen. Da beide Patienten aber einen äußerst unterschiedlichen Phänotyp von FHC zeigten, ist die funktionelle Charakterisierung über *in vitro* Motilitätsassays offensichtlich unzureichend, um unterschiedliche Ausprägungen der Krankheit zu erklären (Cuda et al., 1993).

Zusammenfassend ist festzustellen, dass trotz der verschiedenen Erklärungsansätze der pathogenetische Prozess, durch den FHC entsteht, unklar bleibt, wobei vor allem die Variabilität des Phänotyps nicht erklärt werden kann. Neben den betrachteten und bekannten Mechanismen, über die eine Mutation wirken kann, könnten weitere Faktoren den Phänotyp modulieren. Zum Beispiel könnte die Mutation auch ihre pathogene Wirkung entfalten, indem sie die Stabilität der mRNA, die Prozessierung und Sekretion des Proteins, sowie dessen Inkorporation in die Fibrillenstruktur beeinträchtigt. Zur Erforschung der pathogenen Wirkung einer Mutation sollte daher der gesamte Weg der Genexpression, von der DNA-Ebene bis zum Zielort des Proteins, untersucht werden (Wilkie, 1994).

2.3 Mausmodelle für FHC

In einem Mausmodell konnte zum ersten Mal direkt gezeigt werden, dass eine Mutation in der schweren Kette des Myosins zu dem im Menschen beobachteten Krankheitsbild führt.

Das erste Tiermodell für FHC wurde durch Einführung der Arg 403 → Gln MYH7 Mutation in das α -MHC-Gen (MYH6) der Maus erzeugt, da adulte Mäuse ausschließlich die α -Isoform der schweren Kette des Myosins exprimieren. Es handelt sich um ein heterologes Modell, da die humane MYH7 Mutation in das murine MYH6 Gen eingeführt wurde.

Die lebensfähigen, heterozygoten Arg 403 → Gln Mäuse zeigten bereits ab der fünften Lebenswoche Herzfehlfunktionen. Ab der dreißigsten Lebenswoche zeigten sich die gleichen histopathologischen Merkmale wie bei menschlicher FHC, wobei die Mäuse

keine Hypertrophie des Ventrikels ausbildeten. Da plötzlicher Herztod beim Menschen oft nach körperlicher Belastung auftritt (Maron et al., 1982), mussten die Mäuse ein regelmäßiges Schwimmtraining absolvieren. Dieses hatte zum Teil tödliche Folgen, da die Mäuse während oder nach dem Training verstarben. Es führte schließlich aber zu der charakteristischen Vergrößerung der linken Herzkammer, die charakteristisch für FHC beim Menschen ist (Geisterfer-Lowrance et al., 1996). Da die homozygoten Arg 403 → Gln Mäuse innerhalb einer Woche starben, wurde spekuliert, dass bei homo- und heterozygoten Tieren mutiertes und wildtyp Protein in unterschiedlicher Menge ins Sarkomer inkorporiert worden sein könnte, wodurch das charakteristische fokale Absterben von Myocyten bei FHC erklärt werden könne (Fatkin et al., 1999).

Wenn das mutierte Protein wirklich exprimiert und in die Muskelfasern inkorporiert wurde, würden die Tiermodelle die Hypothese des dominant negativen Effekts der Arg 403 → Gln MYH7 Mutation bestätigen. Diese Mutation führt zu veränderter Herzfunktion und -struktur. Aus diesen Ergebnissen kann versuchsweise ein Modell der Krankheitsentwicklung durch die Arg 403 → Gln Mutation abgeleitet werden: Der Einbau des mutierten Proteins könnte die Sarkomerfunktion ändern. Hierdurch würde sich zuerst die Herzfunktion ändern, die dann die Sarkomer- und Myocytenstruktur verändert. Diese Strukturänderungen unterstützen wiederum die Fehlfunktion des Herzens, welches darauf kompensatorisch eine Hypertrophie ausbildet. Zusätzlich könnten dann weitere genetische oder Umweltfaktoren Einfluss auf den Phänotyp ausüben (Bonne et al., 1998).

Festgehalten werden kann, dass bei dem Strukturprotein Myosin eine Mischung aus wildtyp und mutiertem Protein wahrscheinlich die Sarkomerenfunktion beeinträchtigt. Dies geschieht bei fast allen Mutationen und erklärt zu einem gewissen Maße, wie die Myosinmutationen FHC erzeugen. Die beschriebene Heterogenität der Krankheit, von verschiedenen und gleichen Mutationen verursacht, kann damit nicht erklärt werden. Bei den Untersuchungen wurde allerdings angenommen, dass das mutierte Protein sowohl exprimiert als auch in die Muskulatur inkorporiert wurde. Um eine Hypothese über einen möglichen Mechanismus, durch den die Mutationen FHC erzeugen, aufzustellen, ist aber unbedingt der Nachweis des mutierten Proteins notwendig. Die Untersuchungen, mit denen festgestellt werden sollte, welche Zusammenhänge zwischen einer Mutation und dem FHC-Phänotyp bestehen, werden im folgenden Kapitel erläutert.

2.4 Übersicht der möglichen Faktoren, die den Schweregrad von FHC beeinflussen

Verschiedene Mutationen im Myosin führen zu verschiedenen schweren Krankheitsverläufen bei betroffenen Patienten. Selbst die gleiche Mutation kann nicht nur in verschiedenen Familien zu unterschiedlichen Phänotypen führen, sondern sogar bei Mitgliedern der gleichen Familie klinisch unterschiedliche Auswirkungen haben. Die möglichen Gründe für diese Variabilität werden im Folgenden aufgeführt.

Um den Schweregrad und Verlauf der FHC beurteilen zu können, wurde versucht, verschiedene Merkmale der Krankheit zueinander in Beziehung zu setzen. Es sollten Zusammenhänge zwischen der Sterblichkeit, der Art der Mutation, der Nettoladung des Proteins oder der Hypertrophie der Herzen betroffener Patienten gefunden werden (Anan et al., 1994; Fananapazir and Epstein, 1994; Maron et al., 1982; Tesson et al., 1998; Watkins, 2000; Watkins et al., 1992).

Die Überlebensstatistik (Kaplan-Meier-Überlebenskurven) variiert für verschiedene Myosinmutationen sehr stark. Normales Überleben zeigte sich zum Beispiel bei einer Familie mit der Val 606 → Met Mutation, während 50 Prozent der Patienten mit einer Arg 453 → Cys Mutation bis zum Alter von 40 Jahren verstorben waren (Watkins et al., 1992). Aus diesen Überlebensstatistiken, erstellt aus den Daten sehr weniger Familien, wurde eine Unterteilung in benigne, maligne und intermediäre Mutationen vorgenommen. Benigne Mutationen sollten sich durch eine fast normale Lebenserwartung des Patienten auszeichnen, maligne durch eine signifikant reduzierte Lebenserwartung und intermediäre durch einen moderaten Effekt auf die Lebenserwartung (Anan et al., 1994).

Um einen Zusammenhang zwischen einer bestimmten Myosinmutation und der damit verbundenen Sterblichkeit zu finden, wurde die Nettoladung des Proteins zusammen mit dem Ort der Mutation, als korrelierender Faktor diskutiert. Eine Ladungsänderung in einer wichtigen Domäne könnte sich auf die Funktion des Proteins auswirken. Die Val 606 → Met Mutation in der Aktinbindungsstelle (*50 kDa crossover Region*) (Rayment et al., 1995) führt im Protein zu keiner Nettoladungsänderung. Die ersten untersuchten Familien zeigten eine gute Überlebensstatistik (Watkins et al., 1992). Die Arg 719 → Trp Mutation, die in vier unabhängigen Familien gefunden wurde, führt in vielen Fällen zum vorzeitigen Tod. Die mittlere Lebenserwartung von betroffenen Patienten beträgt nur 38 Jahre. Der Aminosäureaustausch im Bindungsbereich der elementaren, leichten Ketten

führt zu einer Ladungsänderung von -1 (Anan et al., 1994). Aus diesen unterschiedlichen Auswirkungen der Mutationen wurde die Hypothese abgeleitet, dass eine Mutation, die einen Ladungswechsel im Protein hervorruft, die Lebenserwartung stärker beeinflusst, als eine ladungsneutrale Mutation. Außerdem wurde postuliert, dass eine Mutation im Kopf/Hals-Übergangsbereich oder im Halsbereich des Myosins gutartig, im Kopfbereich aber bösartig sei (Anan et al., 1994). Im Gegensatz hierzu wurde von einer Familie mit der Val 606 \rightarrow Met Mutation berichtet, die bisher als benigne angenommen wurde, in der vier von acht Patienten an plötzlichem Herztod starben. Die Theorie der malignen und benignen Mutationen kann in dieser Form daher angezweifelt werden (Fananapazir and Epstein, 1994). Prämisse dieser Korrelationen ist, dass das mutierte Protein nicht nur exprimiert und inkorporiert wird, sondern dass dies bei allen betrachteten Mutationen auch in vergleichbarem Umfang geschieht.

Des Weiteren wurde versucht, eine Korrelation zwischen der jeweiligen Mutation und der Hypertrophie des Patientenherzen abzuleiten und für Prognosen zu benutzen. Eine maligne Arg 719 \rightarrow Trp Mutation sollte zum Beispiel eine stärkere Hypertrophie verursachen, als eine gutartige Leu 606 \rightarrow Val Mutation (Abchee and Marian, 1997). Auch wenn diese Beobachtungen im Einzelfall zutrafen, konnte keine allgemeingültige Gesetzmäßigkeit abgeleitet werden. Es stellte sich außerdem heraus, dass auch vom Ausmaß der Hypertrophie nicht auf die Wahrscheinlichkeit eines plötzlichen Herztodes geschlossen werden kann (Maron et al., 1982; Watkins, 2000). Eine Studie aus dem Jahre 1998 stellt dies noch einmal zusammenfassend fest: Die klinischen und genetischen Charakteristika von Familien mit verschiedenen Mutationen zeigen, dass eine Prognose in keinem Zusammenhang mit dem Ausmaß der Wanddicke des linken Ventrikels oder mit der Nettoladung des Proteins steht (Tesson et al., 1998).

Zusätzlich zu den verschieden schwer verlaufenden Krankheitsbildern von Patienten mit verschiedenen Mutationen gibt es eine weitere Variabilität der Krankheit bei Patienten mit der gleichen Mutation, auch innerhalb einer Familie (Epstein et al., 1992; Fananapazir and Epstein, 1994; Watkins et al., 1992). Beispielsweise variiert die Hypertrophie in drei Familien, die Träger der Val 606 \rightarrow Met Mutation sind, in einem großen Bereich. Hierzu wurde diskutiert, dass es zusätzlich zur Mutation in der β -MHC weitere genetische oder Umweltfaktoren geben müsse, die diese Phänotypen hervorrufen. Um bessere Aussagen zur Korrelation zwischen Mutationen im Myosin und dem Phänotyp von FHC machen zu können, wurde gefordert, weitere Familien zu untersuchen (Kelly and Strauss, 1994).

Wenn Variablen wie die Expression und Inkorporation der Mutante bei der phänotypischen Ausprägung von FHC eine Rolle spielen, müssten diese neben der klinischen Charakterisierung ebenfalls untersucht werden, um eine mögliche Korrelation überhaupt finden zu können.

Abschließend betrachtet stellt sich heraus, dass bis jetzt kein verlässlicher Zusammenhang zwischen der Mutation und dem Schweregrad der Krankheit nachgewiesen wurde. Jeder Versuch eine Regel aufzustellen ist gescheitert, was besonders drastisch am Beispiel der sogenannten benignen Mutation Val 606 → Met deutlich wird: Eine Familie zeigte fast keine phänotypische Ausprägung von FHC, während eine zweite Familie von einer hohen Sterblichkeitsrate betroffen war.

Bei allen Korrelationsversuchen wird davon ausgegangen, dass bei heterozygoten Patienten mit einer autosomal dominanten Erbkrankheit wildtyp und mutiertes Allel zu gleichen Teilen exprimiert werden. Diese Annahme wurde scheinbar bestätigt durch die erste Untersuchung, in der das Verhältnis von wildtyp zu mutiertem Myosin in humanen Proben mit der Arg 403 → Gln Mutation ermittelt wurde (Malinchik et al., 1997). In einer zweiten Studie eines Patienten mit der Val 606 → Met Mutation, der eine schwache Symptomatik von FHC zeigte, machte das mutierte Myosin aber nur 12 Prozent des Gesamtmyosins aus. Dies war überraschend und widerlegte damit zum ersten Mal die Annahme äquivalent exprimierter Allele (Nier et al., 1999).

Dieser überraschend geringe Gehalt an mutiertem Myosin des Patienten mit der Val 606 → Met Mutation (Nier et al., 1999), warf die Frage auf, ob die Abweichung vom 1:1 Verhältnis von Wildtyp und Mutante ein Phänomen der Proteinbiosynthese ist oder bereits auf Transkriptionsebene entsteht (siehe Abbildung 3.1).

FHC-Patienten befinden sich in der misslichen Lage, von einer potentiell tödlichen Krankheit betroffen zu sein, ohne ihr eigenes Risiko abschätzen zu können. Diese Risikoabschätzung kann aber für einige Patienten lebensnotwendig sein, wenn darüber entschieden werden muss, präventiv einen Defibrillator zu implantieren.

3 Ziele und Hypothesen der Arbeit

FHC stellt sich mit äußerst heterogenem Krankheitsbild dar. Die Spanne reicht von völliger Symptombfreiheit, fortschreitender Herzinsuffizienz bis hin zum plötzlichen Herztod. Unterschiedliche Mutationen führen bei dieser Erbkrankheit zu unterschiedlich schweren Krankheitsverläufen. Aber auch gleiche Mutationen in unterschiedlichen Familien und sogar gleiche Mutationen in gleichen Familien können unterschiedliche Symptome verursachen. Bisherige Versuche, eine Korrelation zwischen dem Schweregrad von FHC und der Mutation oder einem anderen Krankheitsmerkmal herzustellen, waren nicht erfolgreich. Sowohl die Diagnose als auch die Therapie von FHC sind daher erschwert.

In der Untersuchung eines Patienten mit der Val 606 → Met Mutation, der eine schwache Symptomatik von FHC zeigte, wurde ein Anteil von nur 12 Prozent mutierter β -MHC an Gesamtmenge der β -MHC ermittelt (Nier et al., 1999). Damit konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass bei einem heterozygoten FHC Patienten, die Allele nicht immer in gleichem Verhältnis exprimiert werden.

In dieser Arbeit soll nun untersucht werden, ob sich in anderen Patienten ebenfalls ein von 50 Prozent abweichender Gehalt an mutiertem Myosin nachweisen lässt und ob der klinische Schweregrad von FHC nicht nur mit der Art der Mutation, sondern auch mit der Menge des mutierten Myosins in Zusammenhang steht.

Das erste Ziel war, festzustellen, ob ein weiterer phänotypisch wenig betroffener Patient einen geringen Gehalt an mutiertem Myosin aufweist. Als nächstes sollte dann die Probe eines massiv betroffenen Patienten untersucht werden. Sollte unsere Hypothese stimmen, dass der Schweregrad der Krankheit auch mit dem Gehalt an mutiertem Myosin korreliert, sollte der Gehalt in diesem Fall eher höher sein als bei weniger betroffenen Patienten.

Der überraschend geringe Gehalt an mutiertem Myosin des Patienten mit der Val 606 → Met Mutation (Nier et al., 1999), warf die Frage auf, auf welcher Stufe der Genexpression die Abweichung vom 1:1 Verhältnis entsteht. Ausgehend von der 1:1 Anlage von wildtyp und mutiertem Allel auf DNA-Ebene ergeben sich Abweichungsmöglichkeiten auf Transkriptions-, Translations-, Protein- und Filamentebene (siehe Abbildung 3.1). Um Aufschluss darüber zu erhalten, ob diese Abweichung bereits

im ersten Schritt der Genexpression, der Translation stattfindet, sollte das Verhältnis von wildtyp zu mutierter mRNA untersucht werden.

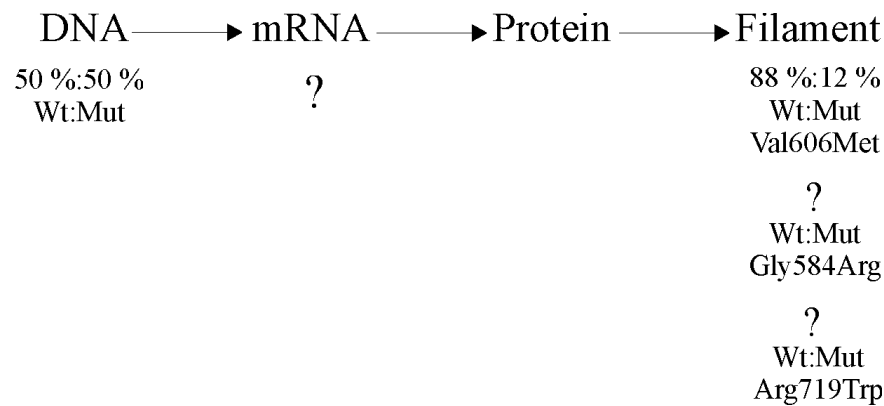


Abbildung 3.1 Bekannte Verhältnisse der β -MHC-Genexpression und Ziele der Arbeit.

Die bekannten Verhältnisse von wildtyp und mutiertem Myosin auf DNA- und Filamentebene. Die Verhältnisse mit Fragezeichen sollen in dieser Arbeit bestimmt werden.

Bei einem gering betroffenen Patienten mit der Val 606 → Met Mutation wurde mit 12 % ein überraschend geringer Anteil mutierter β -MHC an der Gesamt- β -MHC gefunden. Aus diesem Grund soll ein weiterer Patient (Gly 584 → Arg Mutation) mit mildem Phänotyp untersucht werden. Anschließend soll der Gehalt an mutierter β -MHC bei einem schwer betroffenen Patienten (Arg 719 → Trp) ermittelt werden.

Um Hinweise zu erhalten, auf welcher Stufe der Genexpression mögliche Abweichungen vom angelegten 1:1 Verhältnis von wildtyp und mutiertem Allel entstehen, soll im zweiten Teil der Arbeit bei den gleichen Patienten der Anteil mutierter an der gesamten β -MHC mRNA ermittelt werden.

Für die Untersuchungen auf Filamentebene standen gehäutete Muskelbündel eines gering betroffenen Patienten H 2 mit der Gly 584 → Arg Mutation und eines stark betroffenen Patienten H 13 mit der Arg 719 → Trp Mutation zur Verfügung. Native Muskelbiopsien für die Bestimmung des Anteils mutierter an der Gesamt- β -MHC mRNA waren von dem gering betroffenen Patienten H 5 mit der Val 606 → Met Mutation und dem Patienten H 13 (Arg 719 → Trp) vorhanden.

Zur Ermittlung des Anteils mutierter β -MHC an der Gesamt- β -MHC aus den Muskelbündeln sollte eine im Arbeitskreis entwickelte Methode, eine Kombination von HPLC, Massenspektrometrie und Kapillarelektrophorese (CE) angewandt werden (Nier et al., 1999). Sollte sich diese Methode nicht auf die Untersuchung anderer Mutationen übertragen lassen, müsste sie angepasst oder weiterentwickelt werden.

Die verwendete Analyse­methode soll ermöglichen wildtyp und mutiertes Myosin nebeneinander nachweisen und quantifizieren zu können. Hierfür soll das Myosin aus den Faserbündeln isoliert und mit einer spezifischen Endoproteinase zerkleinert werden. Die Mutation wirkt sich in dem sehr großen Myosinmolekül nicht auf eine Weise auf die physiko-chemische Eigenschaften aus, die eine Trennung von wildtyp und mutiertem Protein ermöglichen würde. Der Aminosäureaustausch sollte die Eigenschaften in einem kleineren Peptide dagegen dermaßen beeinflussen, dass eine Auftrennung mit HPLC oder CE möglich ist. Als Vergleichssubstanzen sollen die wildtyp und mutierten Verdaufragmente als synthetische Peptide hergestellt werden.

In einem ersten HPLC-Schritt soll die große Anzahl an Verdaufragmenten fraktioniert werden. Über den Vergleich mit der Retentionszeit der Vergleichssubstanzen sollen die HPLC-Frak­tionen mit wildtyp und mutiertem Verdaufragment ermittelt werden. Die Auswahl soll durch Massenspektrometrie überprüft werden. In einem zweiten Chromatographieschritt der ausgewählten und zusammengeführten HPLC-Frak­tionen sollen wildtyp und mutiertes Peptid von den anderen enthaltenen Peptiden freigestellt werden. Die hierfür geplante Chromatographie ist die Kapillarelektrophorese. Sollte damit keine Freistellung von wildtyp und mutiertem Peptid erreicht werden, könnte auch ein zweiter HPLC-Schritt mit veränderten Laufbedingungen angewendet werden. Im zweiten Chromatographieschritt werden die gesuchten Peptide wieder über den Vergleich mit den Retentionszeiten der Vergleichssubstanzen identifiziert. Über Koelution mit den Vergleichssubstanzen unter den gleichen Bedingungen wie im zweiten Chromatographieschritt soll dann abschließend gezeigt werden, welche Peaks das wildtyp und mutierte Peptid enthalten. Die Flächen der auf diese Weise identifizierten Peaks, die nur noch Wildtyp oder Mutante enthalten sollten, sollen dann zueinander ins Verhältnis gesetzt werden. Daraus wird dann der Anteil der mutierten β -MHC an dem Gesamtgehalt der β -MHC in den Faserbündeln erhalten. Die geplanten Analyseschritte sind in Abbildung 3.2 dargestellt.

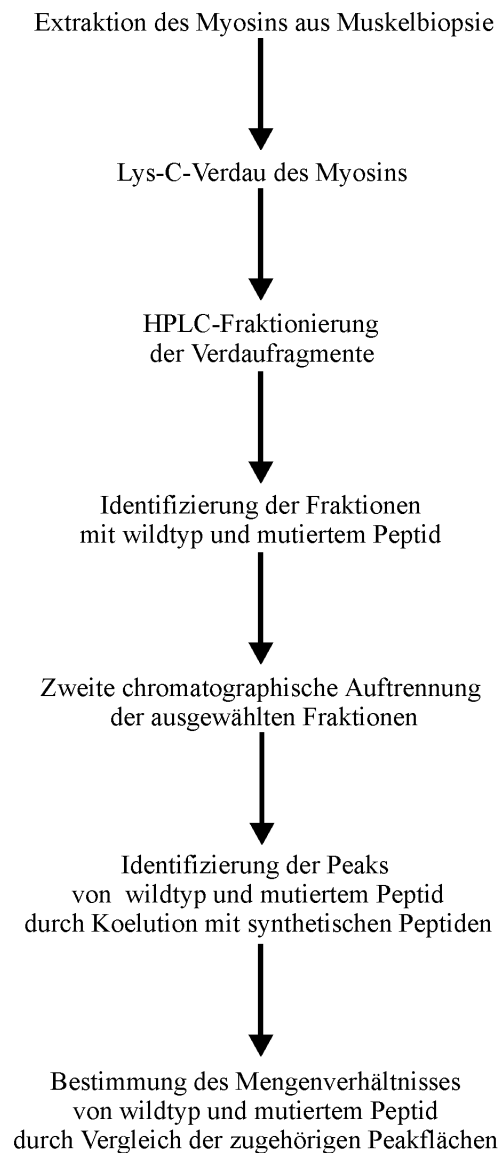


Abbildung 3.2 Analyseschritte zur **proteinchemischen Quantifizierung**.

Abfolge der einzelnen Analyseschritte zur Bestimmung des Anteils mutierter β -MHC am β -MHC-Gesamtgehalt. Die einzelnen Materialien und Methoden sind in den Kapiteln 4.1 und 4.2, die Ergebnisse in den Abschnitten 0 bis 5.1.5 beschrieben.

Für die Bestimmung des Anteils der mutierten mRNA an der gesamten β -MHC mRNA soll zuerst die RNA aus den nativen Muskelbiopsien isoliert werden. Danach soll eine reverse Transkription in cDNA erfolgen. Für die anschließende PCR sollen Primer konstruiert werden, die die Mutation flankieren und nur die cDNA der β -Isoform des Myosins amplifizieren. Durch die Positionierung der Primer auf den Spleißstellen soll

außerdem verhindert werden, dass verunreinigende genomische DNA amplifiziert wird. Da die Patienten heterozygot sind, werden bei der geplanten PCR wildtyp und mutiertes Allel gleichzeitig, in einem Ansatz mit den gleichen Primern, vervielfältigt. Zur Unterscheidung und abschließenden Quantifizierung von wildtyp und mutierter mRNA soll ein Restriktionsverdau eingesetzt werden. Es soll ein Restriktionsenzym ausgewählt werden, bei dem durch die Mutation eine Schnittstelle des Enzyms erzeugt oder vernichtet wird. Nach Auftrennung in einem Agarosegel sollte das Verdauemuster der heterozygoten Patienten unterscheidbare Fragmente für wildtyp und mutiertes Allel zeigen. Nach densitometrischer Auswertung des Gels, können die Mengen der für wildtyp und mutiertes Allel charakteristischen Fragmente bestimmt und zueinander ins Verhältnis gesetzt werden. Daraus wird der Anteil der mutierten an der Gesamt- β -MHC mRNA in den nativen Muskelbiopsien erhalten.

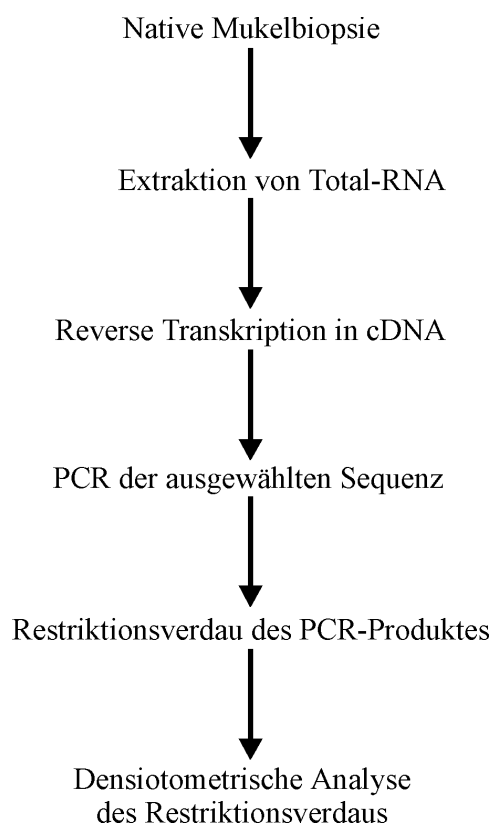


Abbildung 3.3 Fließschema der Versuche zur Quantifizierung der mutierten β -MHC mRNA.

Mit diesen Versuchen wurde der Anteil der mutierten an der Gesamt- β -MHC mRNA aus Biopsien der FHC-Patienten H 13 (Arg 719 \rightarrow Trp) und H 5 (Val 606 \rightarrow Met) bestimmt. Die Ergebnisse der Versuche sind in den Abschnitten 5.2.1 bis 5.2.3 beschrieben.

4 Material und Methoden

4.1 Versuchsmaterial

4.1.1 Herkunft der Muskelbiopsien

Für die Versuche wurden Biopsien aus humanem *musculus soleus* von Patienten mit Familiärer Hypertropher Kardiomyopathie verwendet. Für Kontrollversuche wurde Resektionsmaterial aus *musculus soleus* von gesunden Menschen verwendet.

Für die proteinbiochemische Charakterisierung der Mutationen Gly 584 → Arg (Patient H 2) und Arg 719 → Trp (Patient H 13) standen gehäutete Muskelfaserbündel zur Verfügung. Von Biopsien der Arg 719 → Trp Mutation waren zusätzlich native Muskelstücke für molekularbiologische Arbeiten vorhanden. Für RNA-Arbeiten mit Material der Val 606 → Met Mutation (Patient H 5) wurden native, in Tissue Freezing Medium (Leica Instruments, Nussloch) eingebettete Muskelstücke verwendet. Diese Art der Probenvorbereitung war eigentlich für histologische Untersuchungen gedacht. Da die Reste der eingebetteten Histologieproben aber die einzige Quelle von nativem Muskelmaterial des Patienten waren, wurden sie im Rahmen dieser Arbeit verwendet.

4.1.2 Vorbehandlung der Muskelproben

Präparation von gehäuteten Faserbündeln

Für die proteinchemische Quantifizierung wurden gehäutete Faserbündel verwendet. Die Biopsien wurden nach der Entnahme einheitlich behandelt, um dann sowohl für die Myosinquantifizierung als auch für die funktionelle Charakterisierung von Muskelfasern verwendet werden zu können.

Die Biopsie wurde in Faserrichtung in Bündel von 1 bis 3 Millimeter Durchmesser und 5 bis 15 Millimeter Länge geteilt. Durch ein starkes Detergenz (Triton X-100) wurde die Plasmamembran und das Sarkolemm permeabilisiert, so dass die löslichen Zellbestandteile entfernt wurden. Dies geschah durch 30-minütige Inkubation der mechanisch fixierten Bündel in Häutungslösung mit 0,5 % Triton X-100. Hierauf folgten 30-minütige Inkubationsschritte in Häutungslösung mit 0 M, 0,5 M, 1 M, 1,5 M und 2 M Saccharose. Alle Reaktionen wurden auf Eis oder bei 4°C durchgeführt. Abschließend wurden die Bündel zuerst in flüssigem Propan eingefroren und dann in flüssigem Stickstoff

aufbewahrt. Der Zusatz von Saccharose ermöglicht ein Einfrieren ohne Eiskristallbildung und somit ohne strukturelle Zerstörung der Muskelfasern (Brenner, 1983; Yu and Brenner, 1989; Kraft et al., 1995a; Kraft et al., 1995b).

Häutungslösung:

5 mM Kaliumphosphatpuffer, 3 mM Magnesiumacetat, 5 mM EGTA, 3 mM ATP, 47 mM Kreatinphosphat, 5 mM Natriumazid, 10 mM Glutathion, 1 mg/ml Aprotinin, 10 μ M Antipain, 10 μ M Pepstatin A, 10 μ M E 64, 1 mM AEBSF, pH 6,8

Präparation von nativen Faserbündeln

Für die molekularbiologischen Arbeiten wurden, wie oben beschrieben, kleine Stücke der Biopsie abgeteilt und ohne weitere Behandlung sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren.

Präparation von nativem Versuchsmaterial aus Histologieproben

Einige Stücke der nativen Muskelbiopsien der Val 606 \rightarrow Met Mutation wurden ebenfalls sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren, vorher jedoch auf ein Korkstück gesetzt und für histologischen Untersuchungen mit Tissue Freezing Medium umhüllt. Da die Proben während dieser Untersuchungen zu keiner Zeit aufgetaut waren und anschließend bei -80°C gelagert wurde, konnten das Restmaterial für die Durchführung von molekularbiologischen Arbeiten verwendet werden.

Nach Entnahme der Probe aus dem Gefrierschrank, wurde während des Erwärmens das sich verflüssigende Tissue Freezing Medium (ungefähr bei -20°C) mit einem Skalpell mechanisch entfernt. Bevor die Probe vollständig aufgetaut war, wurde sie direkt in TRIzol-Lösung gegeben und weiterverarbeitet (Abschnitt 4.3.1).

Die Überprüfung der isolierten RNA (Abschnitt 4.3.3) ergab, dass diese Art von Histologiematerial problemlos für mRNA-Quantifizierung verwendet werden kann.

4.1.3 Synthetische Peptide

Als wichtige Hilfsmittel für die HPLC und die CE wurden synthetische Peptide verwendet. Sie wurden zur Bestimmung der Retentionszeiten und als Vergleichssubstanzen zur Koelution benötigt.

Die Peptide entsprachen Fragmenten aus dem Lys-C-Verdau von Myosin. Es wurde jeweils das Verdaufragment ausgewählt, das die Peptidsequenz mit der zu untersuchenden

Mutation enthielt. Es wurden wildtyp und mutierte Peptide für die Gly 584 → Arg und die Arg 719 → Trp Mutation synthetisiert (Sequenz siehe Abbildung 4.1). Der Peptidgehalt und die Richtigkeit der Syntheseprodukte wurden mit einer Aminosäureanalyse festgestellt. Die Peptide wurden freundlicherweise vom Niedersächsischen Institut für Peptidforschung synthetisiert.

Peptid	Sequenz	Molekulargewicht
Gly 584	GKPEAHFSLIHYA <u>G</u> IVDYNIIGWLQK	2970,4 Da
Gly 584 → Arg	GKPEAHFSLIHYA <u>R</u> IVDYNIIGWLQK	3069,6 Da
Arg 719	GFPNRILYGDF <u>R</u> QRYRILNPAAIPEGQFIDSRK	3909,5 Da
Arg 719 → Trp	GFPNRILYGDF <u>W</u> QRYRILNPAAIPEGQFIDSRK	3939,5 Da

Abbildung 4.1 Sequenzen der Peptide nach Lys-C-Verdau von Myosin.

Sequenzen und Molekulargewichte der wildtyp und mutierten Peptide, die aus dem Lys-C-Verdau des Myosins identifiziert und analysiert wurden. Sequenzunterschiede zwischen Wildtyp und Mutante sind durch Unterstreichung gekennzeichnet. Diese Peptide wurden als Vergleichssubstanzen synthetisch hergestellt. Das wildtyp Peptid Gly 584 und das mutierte Peptid Gly 584 → Arg wurden für die Untersuchung des Patienten H 2 verwendet. Das wildtyp Peptid Arg 719 und das mutierte Peptid Arg 719 → Trp wurden für die Untersuchung des Patienten H 13 verwendet.

4.1.4 Gebrauchsmaterialien

Da die wildtyp und mutierten Peptide der Mutation Arg 719 → Trp Adsorptionserscheinungen an Gebrauchsmaterialien zeigten, wurden ausschließlich silikonisierte Reaktionsgefäße und Pipettenspitzen verwendet.

Die molekularbiologischen Arbeiten fanden unter den üblichen sterilen und RNase freien Bedingungen statt.

4.2 Protein-Quantifizierung

4.2.1 Isolierung von Myosin

Das Myosin wurde nach einer modifizierten Hasselbach-Schneider-Methode isoliert (Hasselbach and Schneider, 1951). Durch die hohe Ionenstärke und den Gehalt an ATP des Extraktionspuffers wurde die Bindung zwischen Aktin und Myosin in der Muskelfaser getrennt und das Myosin aus der Faser gelöst. Durch anschließendes Absenken der Ionenstärke fiel das Myosin aus und konnte in reiner Form erhalten werden.

Die in flüssigem Stickstoff eingefrorenen Muskelbündel wurden, eingebettet in ein Stück Parafilm, mit einem Hammer zertrümmert und mit 150 µl Extraktionspuffer (500 mM Natriumchlorid, 10 mM HEPES, 5 mM Magnesiumchlorid, 2,5 mM ATP) versetzt. Nach 15-minütiger Inkubation wurde die Lösung für 5 Minuten bei 13 000 x g abzentrifugiert und der Überstand im Verhältnis 1:10 mit destilliertem Wasser verdünnt. Nach dreitägiger Fällung bei 4°C wurde das Myosin abzentrifugiert (15 Minuten, 13 000 x g), das Pellet mit 100 µl 0,1 % TFA versetzt und zur Trockne lyophilisiert.

4.2.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese mit dem PhastSystem

Das PhastSystem (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) ist ein automatisiertes Elektrophoresesystem. Die vorgegossenen Gele (45 x 50 x 0,45 mm) bestehen aus Sammel- und Trenngel und sind mit unterschiedlichen Acrylamidkonzentrationen erhältlich. Für die Analyse von Myosin wurden 12,5 prozentige Gele verwendet. Die Gele enthielten einen Puffer mit 0,112 M Natriumacetat und 0,112 M TRIS, pH 6,4. Die Elektrodenpuffer waren in vorgefertigten Streifen aus 2 % Agarose enthalten (0,2 M TRICIN, 0,2 M TRIS, 0,55 % SDS, pH 8,1).

Die Proben wurden mit 4 fach-konzentriertem Probenpuffer Rotiload1 (Roth, Karlsruhe) versetzt und für 5 Minuten bei 95°C erhitzt. Mit einem Applikationskamm wurde 1 µl der Probenlösung automatisiert auf das Gel aufgebracht. Zusätzlich wurde ein Molekulargewichtsstandard aufgetragen, wie der Wide Range und Low Range Sigmamarker (Sigma, Taufkirchen) oder das Peptide Marker Kit (Pharmacia Biotech, Freiburg). Bei der Elektrophorese wurde die Stromstärke konstant gehalten, so dass sich die Spannung bis zu einem Maximalwert erhöhen konnte. Die Laufbedingungen für ein 12,5 prozentiges Gel sind in Abbildung 4.2 zusammengestellt.

	<i>Spannung</i> [V]	<i>Stromstärke</i> (Venter et al.,)	<i>Leistung</i> [W]	<i>Temperatur</i> [°C]	<i>Dauer</i> [Vh]
Vorlauf	250	10	3	15	1
Probenauftrag	250	1	3	15	1
Trennung	250	10	3	15	70

Abbildung 4.2 Elektrophoresebedingungen für ein 12,5 prozentiges Phastgel.

Die Elektrophorese mit dem PhastSystem ist in drei Stufen unterteilt: den Vorlauf, den Probenauftrag und die eigentliche Trennung. Die Parameter, die für die entsprechenden Stufen programmiert und durchlaufen wurden sind abgebildet.

4.2.3 Färbung von Proteinen in SDS-Gelen mit Coomassie Brilliant Blue

Durch Auflösen einer Phastgel Blue R Tablette (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) in 80 ml bidest. Wasser, Zugabe von 120 ml 100% Methanol und Abfiltrieren wurde eine 0,2 prozentige Coomassie-Stammlösung hergestellt. Sie wurde bei 4°C aufbewahrt. Für die Gebrauchslösung wurde die Stammlösung mit 20 prozentiger Essigsäure im Verhältnis 1:1 gemischt. Zum Anfärben der Proteine wurde das Gel für 15 Minuten in die Gebrauchsfärbelösung gelegt. Durch Inkubation unter Schütteln, für ungefähr zwei Stunden in einer Lösung aus 10 % Methanol und 10 % Essigsäure wurde das Gel entfärbt, so dass die Proteinbanden sichtbar wurden.

4.2.4 UV-Spektrometrische Vermessung der synthetischen Peptide

Die synthetischen Peptide wurden UV-spektrometrisch (DU 640 Spektrophotometer, Beckmann Instruments, Fullerton, CA, USA) untersucht, um die Absorption bei 215 nm und 200 nm festzustellen. Diese Wellenlängen werden während der HPLC und Kapillarelektrophorese verwendet. Es wurde eine Konzentrationsreihe der wildtyp und mutierten Peptide in Wasser hergestellt und gegen Wasser als Referenzwert vermessen.

4.2.5 Verdau des Myosins mit der Endoproteinase Lys-C

Das isolierte und gereinigte Myosin (Abschnitt 4.2.1.) wurde mit der Endoproteinase Lys-C (Roche Diagnostics, Mannheim) in 197 Fragmente unterschiedlicher Länge gespalten. Das Enzym wurde so ausgewählt, dass die zu untersuchenden Mutationen inmitten eines Verdaufragmentes lagen. Lys-C ist eine Serinproteinase, die sehr spezifisch

Peptidbindungen C-terminal von Lysin hydrolysiert. Sie arbeitet in einem pH-Optimum von 7,5 bis 8,5 und ist stabil gegen Autoproteolyse.

Der Verdau fand in einem 0,1 M Ammoniumhydrogencarbonatpuffer, pH 8 statt. Es wurden 5 µg des Enzyms in 200 µl des Puffers aufgenommen und zu dem lyophilisierten Myosin gegeben. Die Reaktion wurde für 24 Stunden bei 37°C unter Schütteln (600 min⁻¹) inkubiert. Die Reaktion wurde durch zur Trockne Lyophilisieren abgebrochen. Das Pellet konnte auf diese Weise von Ammoniumhydrogencarbonat befreit werden.

4.2.6 Chromatographische Auftrennung des Myosinverdaus

Peptide werden mit HPLC-Chromatographie auf unpolaren Trägermaterialien, den sogenannten Umkehrphasen getrennt. Es kommt zu hydrophoben Wechselwirkungen des Analyten mit der unpolaren stationären Phase im polaren, wässrigen Lösungsmittel. Bei der Elution konkurriert das unpolare, organische Lösungsmittel mit dem adsorbiertem Molekül um die Bindungsstellen. Für die zu trennenden Peptide müssen die optimalen Trägermaterialien und Laufmittel experimentell ermittelt werden.

Um wildtyp und mutiertes Peptid als eindeutig identifizierbare Peaks zu erhalten, wurden zwei verschiedene Methoden verwendet. Die erste Methode bestand aus einer Kombination von eindimensionaler HPLC mit darauffolgender Kapillarelektrophorese (CE). Für die zweite Methode, eine zweidimensionale HPLC, wurden zwei HPLC Schritte mit verschiedenen Säulen und Laufmitteln hintereinander durchgeführt.

Für die HPLC-Auftrennung wurde das verdaute, lyophilisierte Myosin (Abschnitt 4.2.5) in 0,1% TFA aufgenommen.

Eindimensionale HPLC-Auftrennung

Für die eindimensionale HPLC-Auftrennung des Myosinverdaus wurde ein Hochdruckgradientensystem der Firma Kontron (Kontron, Ergolding) verwendet. Die Probe wurde mit einer Hamilton-Spritze in eine 50 µl Probenschleife gebracht und mit manueller Injektion auf eine *Narrowbore* Säule (Nukleosil, 3 µm, 100 Å, C18 HD, 125 x 2 mm, Macherey-Nagel, Düren) geleitet. Die Säule wurde auf 35°C temperiert. Als Laufmittel A wurde 0,1 % TFA in HPLC-reinem Wasser, als Laufmittel B eine Mischung aus 40 % Methanol, 40 % Isopropanol und 0,085 % TFA verwendet. Der verwendete Gradient ist in der folgenden Abbildung dargestellt.

<i>Zeit</i> <i>[min]</i>	<i>Solvens A</i> <i>[%]</i>	<i>Solvens B</i> <i>[%]</i>	<i>Fluss</i> <i>[ml/min]</i>
0	90	10	0,2
5	90	10	0,2
80	20	80	0,2
85	90	10	0,2

Abbildung 4.3 HPLC-Gradient der eindimensionalen Auftrennung.

Zusammensetzung des Laufmittelgemisches während der 80-minütigen HPLC-Auftrennung.

Die HPLC-Anlage detektiert die aufgetrennten Peptide bei 215 nm und fängt sie mit einem Fraktionssammler (Biorad Laboratories, München) in Abständen von einer Minute auf. Die Flussrate des Laufmittelgemisches betrug 0,2 ml pro Minute. Parallel wurde an den UV-Detektor ein Schreiber angeschlossen, der das Elektropherogramm aufzeichnete.

Zweidimensionale HPLC-Auftrennung

Für die zweidimensionale HPLC-Auftrennung wurde das LaChrom Niederdruckgradientensystem der Firma Merck Hitachi (Merck, Darmstadt) benutzt. Die Probe wurde manuell mit einer Hamilton-Spritze aufgegeben. Reproduzierbare Laufbedingungen wurden durch Temperieren der Säule auf 35°C geschaffen. Die UV-Absorption erfolgte bei 215 nm und der Laufmittelfluss betrug 0,2 ml/min. Die HPLC-Anlage wurde mit der zugehörigen Software gesteuert, die u.a. auch das Elektropherogramm aufzeichnete. Das Eluat der Auftrennung wurde mit einem Fraktionssammler (Biorad Laboratories, München) aufgefangen.

Im ersten Schritt wurde der Verdau auf einer C4 RP-Säule (Jupiter, 5 µm, 300 Å, C4, 150 x 2 mm, Phenomenex, Aschaffenburg) aufgetrennt. Als Solvens A wurde 0,1 % TFA in Wasser, als Solvens B 70 % Acetonitril und 0,085 % TFA in Wasser verwendet. Hier wurde ein besonders langer und flach ansteigender Gradient gewählt, um bereits im ersten Chromatographieschritt eine möglichst weite Auftrennung des Peptidgemisches zu erhalten. Der ausgeführte Gradient ist Abbildung 4.4 dargestellt.

<i>Zeit</i> <i>[min]</i>	<i>Solvens A</i> <i>[%]</i>	<i>Solvens B</i> <i>[%]</i>	<i>Fluss</i> <i>[ml/min]</i>
0	97	3	0,2
75	50	50	0,2
100	0	100	0,2
105	0	100	0,2

Abbildung 4.4 Laufmittel-Gradient des ersten HPLC-Schrittes der zweidimensionalen Auftrennung.

Zusammensetzung des Laufmittelgemisches während der 100-minütigen ersten Auftrennung der zweidimensionalen HPLC.

Für die Auftrennung von zusammengeführten Fraktionen des ersten HPLC-Laufes wurde eine C18-RP-Säule (Supersphere, 4 μm , 100 \AA , 125 x 2 mm, Merck, Darmstadt) verwendet. Neben dem Laufmittel, das bei der ersten Auftrennung Verwendung fand, wurde auch ein System von 20 mM Phosphatpuffer, pH 2 als Laufmittel A und 70 % Acetonitril mit 30 % Laufmittel A als Laufmittel B benutzt. Der Anteil von Laufmittel B wurde innerhalb von 80 Minuten von 15 % auf 90 % erhöht (siehe Abbildung 4.5).

<i>Zeit</i> <i>[min]</i>	<i>Solvens A</i> <i>[%]</i>	<i>Solvens B</i> <i>[%]</i>	<i>Fluss</i> <i>[ml/min]</i>
0	85	15	0,2
80	10	90	0,2
85	90	15	0,2

Abbildung 4.5 Laufmittel-Gradient des zweiten HPLC-Schrittes der zweidimensionalen Auftrennung.

Zusammensetzung des Laufmittelgemisches während der 80-minütigen zweiten Auftrennung der zweidimensionalen HPLC.

Die HPLC-Spektren wurden mit der Software Origin (Microcal Software, Northampton, MA, USA) ausgewertet. Die Elektropherogramme wurden in Origin importiert. Um die

Flächen zu bestimmen, wurden die Peaks bei festgehaltener Halbwertsbreite mit Gauß-Funktionen angefitet.

Mit einer Vermessung verschieden konzentrierter Lösungen der synthetischen Peptide bei 215 nm auf der HPLC wurde sichergestellt, dass das erhaltene Absorptionssignal proportional zur Menge der vermessenen Analyten war und dass gleiche Mengen aufgetragenen wildtyp und mutierten Peptids gleiche Flächen erzeugen.

Kapillarelektrophorese (CE)

In der Kapillarelektrophorese werden die Analyt-Ionen aufgrund der Mobilitätsunterschiede getrennt. Sowohl Größe als auch Ladung von Teilchen sind für die Trennung entscheidend. Die Kapillare ist mit einem einheitlichen Elektrolytsystem gefüllt, um eine einheitliche Feldstärke und einen konstanten pH-Wert aufrecht zu halten (Schwer, 1998).

Aliquots von 25 µl der ausgewählten und zusammengeführten Fraktionen der eindimensionalen HPLC wurden lyophilisiert und in 5 µl Low pH Mobility Buffer (Applied Biosystems, Weiterstadt) aufgenommen. Die Probe wurde durch 20 Sekunden lange, hydrodynamische Injektion aufgegeben. Es wurde ein PACE-System 2100 Gerät (Beckmann Instruments, Fullerton, CA, USA) mit einer 50 cm langen *fused silica* Kapillare mit einem Innendurchmesser von 75 µm verwendet. Die Peptide wurden *online* bei 200 nm detektiert. Als Elektrophoresepuffer wurde 100 mM Phosphatpuffer, pH 2,5 mit einem Zusatz von 0,02 % Hydroxypropylmethylcellulose verwendet. Während des 21-minütigen Trennvorganges mit 80 Ampere bei 25°C wurde eine Spannung von 1500 V angelegt.

Das gemessene Signal (Absorption bei 200 nm) war linear proportional zur Menge der vermessenen Peptide (Nier et al., 1999). Zur Quantifizierung von Wildtyp und Mutante musste sichergestellt werden, dass gleiche Mengen von wildtyp und mutiertem Peptid, unter Berücksichtigung der unterschiedlichen UV-Absorption, die gleiche Fläche in der Kapillarelektrophorese erzeugten.

4.2.7 Massenspektrometrie

Massenspektroskopische Molekulargewichtsbestimmung

Mit der Massenspektrometrie können Molekülmassen freier Ionen im Hochvakuum bestimmt werden. Im hier verwendeten Massenspektrometer API III (PE Sciex, Langen)

wurden die Analytmoleküle durch Versprühen im elektrischen Feld ionisiert (Elektrospray-Ionisation, ESI). Die Trennung erfolgte in einem Hochfrequenzfeld eines Tripelquadrupol-Stabsystems, die Detektion in einer Konversionsdynode mit Sekundärelektronenvervielfacher (SEV).

Der Begriff Elektrospray beschreibt die Dispersion einer Flüssigkeit in sehr viele, kleine, geladene Tröpfchen mit Hilfe eines elektrostatischen Feldes. Hierbei kommt es zu keiner Fragmentierung. Der Elektrospray-Prozess bewirkt eine definierte Ionisation und komplette Desolvatisierung von in Lösung versprühten Analytmolekülen (Dole et al., 1968; Fenn, 1993). Die schonende ESI Ionisierungstechnik ermöglicht eine Analyse von Peptiden und Proteinen. Mit ihr können auch größere Molekülmasse genau bestimmt werden.

Charakteristischerweise kommt es zur Bildung mehrfach geladener Ionen. Für Peptide und Proteine findet man entsprechend ihrer Masse eine Serie von Ionensignalen, die sich jeweils um eine Ladung unterscheiden. Im hier verwendeten positiven Modus geschieht dies meist durch Addition eines Protons. Im Analysator werden die Ionen entsprechend ihrem Masse-Ladungs-Quotienten (m/z) getrennt, so dass im Massenspektrum die Intensität gegen den m/z -Wert aufgetragen wird.

Die Massendifferenz der wildtyp und mutierten Lys-C-Verdau-Fragmente (Abbildung 4.1) konnte zur Identifizierung der Peptide genutzt werden. Zwischen den beiden Verdauprodukten der Gly 584 → Arg Mutation beträgt der Unterschied 99 Da und zwischen denen der Arg 719 → Trp Mutation 30 Da. Die zusammengeführten Fraktionen, die das wildtyp oder mutierte Peptid enthielten, wurden lyophilisiert und mit MS-Puffer (50 % Acetonitril, 0,5 % Ameisensäure) aufgenommen. Die Peptidlösungen wurden dann in einer Hamilton-Spritze aufgezogen und mit einer Spritzenpumpe in einem kontinuierlichen Fluss von 5 $\mu\text{l}/\text{min}$ in das Massenspektrometer geleitet. Es wurde eine Orifice-Spannung von 80 V angelegt. Während der Aufnahme des Spektrums, d.h. für das Scannen der Quadrupole über den Massenbereich, wurde eine Stufengröße (*step size*) von 0,5 amu und eine Verweildauer auf der jeweiligen Stufe (*dwell time*) von 1 ms eingestellt. Mit der *step size* wird die Genauigkeit, mit der *dwell time* die Empfindlichkeit der Massenbestimmung beeinflusst. Das Produkt von *step size* und *dwell time* entspricht der Scan-Zeit für ein Spektrum. Es wurde ein Bereich von 400 bis 2390 amu gescannt und zehn bis fünfzehn Scans wurden für ein Spektrum aufaddiert. Die Spektren wurden mit

dem zugehörigen Programm MacSpec ausgewertet. Das Massenspektrometer wurde täglich mit Polypropylenglykol, entsprechend den Angaben des Herstellers, kalibriert.

Massenspektroskopische Sequenzierung von Peptiden

Peptide zerfallen nach Kollisionsaktivierung bevorzugt zwischen dem Carbonylkohlenstoff und dem Amidstickstoff der Peptidkette. Um die Sequenz der Peptide zu bestimmen, kann der erste Quadrupol des Massenspektrometers so eingestellt werden, dass nur Ionen eines bestimmten m/z Wertes passieren können. In der Kollisionskammer des Tripel-Quadrupols werden die Ionen dann über Stoßaktivierung fragmentiert. Die Fragmentierung lässt sich über die Beschleunigungsspannung und den Druck des Kollisionsgases Argon regulieren. Anschließend werden die entstandenen Produktionen im dritten Quadrupol analysiert. Diese massenspektroskopische Technik wird CID (*collision induced decay*) genannt (Eckerskorn, 1998; Haddon and McLafferty, 1968; Jennings, 1968).

Die entstandenen MS/MS Spektren wurden mit dem Programm Sherpa (Alex Taylor, University of Washington) analysiert. Aus den Abständen von Signalen gleich geladener Ionen können die Aminosäuren bestimmt werden, woraus dann die gesamte Sequenz rekonstruiert wird. Es muss also zunächst der Ladungszustand einzelner Peaks bestimmt werden. Erschwert wird die Interpretation von MS/MS Spektren häufig durch die Mischung verschiedener N- und C-terminaler Fragmente (Eckerskorn, 1998).

4.2.8 LC/MS-Kopplung

Die Kopplung von Flüssigkeitschromatographie (LC) und Massenspektrometrie (MS) ermöglicht die Detektion von Molekülmassen unmittelbar nach der chromatographischen Auftrennung. Das Eluat der Chromatographiesäule wird nach der Trennung in ein Elektrospray-Massenspektrometer geleitet, in dem die aufgetrennten Proteinmoleküle nacheinander die Ionenquelle erreichen, ionisiert und deren Massen bestimmt werden. Als Ergebnis wird der Total-Ionenstrom aufgezeichnet (*total ion current*, TIC). Es gibt eine direkte Korrelation der Retentionszeit des Analyten über das UV-Chromatogramm und der entsprechenden Masse über den Total-Ionenstrom (Eckerskorn, 1998).

Es wurde eine HPLC-Anlage der Firma Applied Biosystems über eine Kapillare mit einem Massenspektrometer der Firma PE-Sciex gekoppelt (siehe Abschnitt 4.2.7). Die Peptidmischungen wurden auf einer C18 RP-Säule (Luna, 3 μm , 100 \AA , C18(2), 150 x 1 mm, Phenomenex, Aschaffenburg) mit einem Gradienten von 10 % bis 80 %

Laufmittel B in 80 Minuten getrennt. Laufmittel A bestand aus 0,1 % TFA in Wasser, Laufmittel B aus 80 % Acetonitril mit 0,085 % TFA. Die Flussrate betrug 20 µl/min. Die TIC-Spektren wurden mit der zum Massenspektrometer gehörenden Software MacSpec ausgewertet.

4.3 mRNA-Quantifizierung

4.3.1 Isolierung von Total-RNA mit TRIzol Reagenz

Die nativen Muskelstücke der Proben H 5 (Val 606 → Met) und H 13 (Arg 719 → Trp) (Abschnitt 4.1.2) wurden in gefrorenem Zustand mit 1 ml TRIzol versetzt und sofort mit einem Ultraturrax (IKA, Staufen) homogenisiert. TRIzol ist eine einphasige Lösung aus Phenol und Guanidiniumisothiocyanat. Beim Homogenisieren der Gewebeprobe in TRIzol wurde die Integrität der RNA erhalten, während gleichzeitig die Zellen aufgeschlossen und die Zellkomponenten aufgelöst wurden. Nach 5-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur (RT) wurden 0,2 ml Chloroform zu der Probe gegeben, sie wurde gevortext und nochmals 5 Minuten bei RT inkubiert. Die Phasentrennung wurde durch 15-minütige Zentrifugation bei 13 000 x g und 4°C erreicht. Die gesamte RNA befand sich in der oberen, wässrigen Phase und wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Um DNA-Verunreinigungen zu vermeiden, wurde darauf geachtet, keine Flüssigkeit der Interphase zu transferieren. Durch Zugabe von 0,5 ml Isopropylalkohol wurde die RNA gefällt. Es folgte ein Inkubationsschritt für 10 Minuten bei RT und anschließender Zentrifugation (12 000 x g, 15 Minuten, 4°C). Das RNA-Pellet wurde mit 1 ml 75 % Ethanol gewaschen, gevortext und für 5 Minuten bei 7500 x g und 4°C zentrifugiert. Nach Entfernen des Ethanols wurde die RNA für 10 Minuten bei Raumtemperatur getrocknet, in DEPC-Wasser aufgenommen und für 10 Minuten bei 57°C denaturiert. Einige Microliter der RNA-Lösung wurden zur Konzentrations- und Reinheitsbestimmung (Abschnitt 4.3.2) abgenommen, der Rest wurde mit 3 Volumina absolutem Ethanol versetzt und bei -80°C aufbewahrt.

Die Isolierung von Total-RNA mit TRIzol (Life Technologies, Karlsruhe) stellt eine Weiterentwicklung der weit verbreiteten Ein-Schritt-RNA-Isolierungsmethode von Chomczynski und Sacchi dar (Chomczynski and Sacchi, 1986).

4.3.2 Photometrische Reinheits- und Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Bei 260 nm und 280 nm wurde die Absorption von RNA- und DNA-Lösungen gemessen. Der Wert bei 260 nm gibt Aufschluss über die Nukleinsäurekonzentration, hierbei entspricht eine OD von eins 40 µg/ml einzelsträngiger RNA oder 50 µg/ml doppelsträngiger DNA. Das Verhältnis der Absorption bei 260 nm und 280 nm beschreibt die Proteinkontamination der Probe. Für einen guten Reinheitsgrad sollte der Wert des Quotienten A_{260}/A_{280} zwischen 1,6 und 2 liegen.

4.3.3 Auftrennung von Total-RNA im denaturierenden Agarosegel

Die Integrität der isolierten Total-RNA wurde in einem denaturierenden Agarosegel überprüft. Der Hauptteil der Total-RNA wird durch ribosomale RNAs gebildet. Aufgrund ihrer definierten Länge und großen Menge sind nach der Auftrennung der Total-RNA die 28S und 18S rRNA als diskrete Banden erkennbar. Bei nicht oder nur wenig degradierter RNA liegen diese beiden in einem Mengenverhältnis von 2:1 (28S:18S rRNA) vor.

Für ein 1 %iges denaturierendes Gel wurden 1 g Agarose in 88 ml bidest. Wasser gelöst. Nach dem Abkühlen der Lösung auf ungefähr 60°C, wurden 10 ml 10 x MOPS (200 mM MOPS, 100 mM Natriumacetat, 10 mM EDTA, pH 7, sterilfiltriert) und 1,78 ml 37 %iges Formaldehyd zugegeben. Das Gel wurde sofort gegossen. Die RNA-Proben wurden für 10 Minuten bei 65°C erhitzt und auf Eis abgekühlt. Anschließend wurden ein Denaturierungsmix (50 % Formamid, 7 % 37 %iges Formaldehyd, 1 x MOPS, 0,1 % Bromphenolblau) und Ethidiumbromid (100 µg/ml) zugegeben und die Proben wurden aufgetragen. Der Elektrophoresepuffer bestand aus 1 x MOPS mit 0,22 mM Formaldehyd. Die angelegte Spannung betrug 10 V/cm, so dass eine Elektrophorese ungefähr drei Stunden dauerte, bis die Bromphenolblau-Front 2/3 des Gels überschritten hatte.

4.3.4 Reverse Transkription der Total-RNA

Mit der Reversen Transkriptase, einem Enzym, das zuerst in Retroviren entdeckt wurde, kann aus RNA komplementäre DNA (cDNA) hergestellt werden. Die Reverse Transkriptase ist eine RNA-abhängige DNA-Polymerase. Sie benötigt einen Primer, wofür je nach Anwendung ein Poly-dT-Nukleotid oder ein genspezifischer Primer benutzt

werden kann. Als Produkt entsteht ein RNA-DNA-Hybrid, von dem der RNA-Strang durch Verdau mit RNase H entfernt wird.

Die β -MHC mRNA wurde mit dem SuperScript First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Life Technologies, Karlsruhe) in cDNA umgeschrieben. Als Ausgangsmaterial wurden 5 μ g Total-RNA eingesetzt.

Es wurde ein genspezifischer RT-Primer benutzt (Abbildung 4.6), um für die folgende PCR ein spezifisches Edukt zu erhalten. Der Primer war über der Grenze zweier Exons positioniert, so dass Verunreinigungen genomischer DNA nicht transkribiert werden konnten. Zusätzlich erhöhte der Primer die Genauigkeit und die Prozessivität der Transkription, da nicht mehr die gesamte β -MHC mRNA von ungefähr 6000 bp umgeschrieben werden musste, sondern nur der Teil bis zur Position 2783. Die Position des genspezifischen RT-Primers berücksichtigte, dass die Sequenz der zu untersuchenden Mutationen an den Positionen 1902 und 2241 ebenfalls transkribiert wurden.

Die Total-RNA wurde zusammen mit dem RT-Primer und Nukleotiden für 5 Minuten bei 65°C vorinkubiert und 1 Minute auf Eis gekühlt. Nach Zugabe des Mastermixes, bestehend aus Reaktionspuffer, Magnesiumchlorid, DTT und einem RNase-Inhibitor, folgte eine Erwärmung auf 42°C und die Zugabe der Reversen Transkriptase. Die reverse Transkription bei 42°C dauerte 50 Minuten. Die Reaktion wurde durch 15-minütiges Erhitzen auf 70°C und anschließende Kühlung auf Eis beendet.

Durch einen abschließenden RNase-H-Verdau für 20 Minuten bei 37°C konnte die gewonnene cDNA ohne weiteren Aufreinigungsschritt in die anschließende PCR eingesetzt werden. Die fertige cDNA wurde bei -20°C gelagert.

Primer	Nukleotidsequenz
RTR719W	5'-TGC CAG GTT GTC TTG TTC CG-3'

Abbildung 4.6 Sequenz des genspezifischen Primers RTR719W für die reverse Transkription.

Mit diesem Primer wurde nicht die gesamte β -MHC cDNA revers transkribiert, sondern nur der Abschnitt bis zur Position 2783. Da die Reverse Transkriptase eine geringe Prozessivität besitzt erhöht dieses verkürzte Template die Spezifität der Reaktion.

4.3.5 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Mit der Polymerasekettenreaktion (PCR) kann ein spezifisches DNA-Segment vervielfältigt werden. Die thermisch denaturierte DNA wird mit einer DNA-Polymerase und zwei Primern inkubiert, die die Synthese komplementärer Stränge einleiten. Die Primer werden so ausgewählt, dass sie dem 5'- und 3'-Ende des zu amplifizierenden DNA-Segments entsprechen. In jedem Zyklus von Denaturierung, Primeranlagerung und Strangverlängerung verdoppelt sich die DNA-Menge (Voet and Voet, 1994).

Die Spezifität einer PCR wird durch die Konstruktion der Primer bestimmt. Die hier verwendeten Primer wurden möglichst auf Spleißstellen positioniert, um die Amplifizierung von DNA-Verunreinigungen zu verhindern. Es sollten relativ kurze PCR-Produkte von 300 bp bis 400 bp erzeugt werden, um die Genauigkeit der PCR zu erhöhen. Zusätzlich sollte mindestens ein Primer eines Paares nicht mit der cDNA der α -MHC kreuzreagieren. Die Myosinisoform α -MHC wird zwar nicht in dem untersuchten Gewebe exprimiert, könnte aber dennoch transkribiert worden sein. Für die weitere Analyse des PCR-Produktes der Probe H 5 (Val 606 \rightarrow Met) war es notwendig, einen mutagenen *forward* Primer zu benutzen, damit verdautes wildtyp und unverdautes PCR-Produkt unterschieden werden konnten. Deshalb wurde durch zwei Basenfehlpaarungen im *forward* Primer eine zusätzliche Schnittstelle für das Enzym Nla III erzeugt. Die Sequenzen der konstruierten Primer sind in Abbildung 4.7, die Lage der Primer auf der β -MHC cDNA ist in Abbildung 5.19 und Abbildung 5.23 dargestellt.

Die PCR-Reagenzien wurden aus dem Advantage cDNA PCR Kit (Clontech Laboratories, Heidelberg) verwendet. Der zugehörige Polymerasemix enthält neben der Klen Taq-1 DNA-Polymerase eine *proofreading* DNA Polymerase und einen TaqStart Antikörper, so dass automatisch eine Heißstart-PCR durchgeführt wurde.

Die PCR wurde in 50 µl Ansätzen durchgeführt. Der Mastermix bestand aus 5 µl 10 x Puffer, je 0,25 µl (10 µM) *forward* und *reversed* Primer, 1 µl 50 x dNTP-Lösung und 50 x Polymerasemix. Für die Reaktionen mit H 13 (Arg 719 → Trp) wurden 1 µl Polymerasemix und 0,5 µl cDNA, für H 5 (Val 606 → Met) 0,5µl Polymerasemix und 1 µl cDNA benötigt. Die eingesetzten Mengen wurden experimentell bestimmt.

Als Temperaturcycler diente der Mastercycler gradient (Eppendorf, Hamburg). Ein übliches Temperaturprogramm bestand aus einer Anfangsdenaturierung bei 94°C für 1 Minute, worauf 23-25 Zyklen folgten mit jeweils einem Denaturierungsschritt bei 94°C für 30 Sekunden und einem Anlagerungs- und Elongationsschritt bei 68°C für 3 Minuten. Abschließend fand noch eine dreiminütige Elongation bei 68°C statt.

Primer	Nukleotidsequenz
FEx16 606	5'-TCC CCA AGG CCA CCG ACA TGA CCT TCA AGG CCA AGC TGT TT-3'
RExon 16 II	5'-CTT TGC CCT TCT CAA TAG GCG CAT CAG-3'
719F	5'-ACG AAG TCT CCA GGC GTG ATG GAC AAC C-3'
719R	5'-CTT TTT GTA CTC CAT TCT GGC GAG CAC A-3'

Abbildung 4.7 Primer-Sequenzen für die Analyse der cDNA von Patient H 5 (Val 606 → Met) und H 13 (Arg 719 → Trp).

Sequenz des *forward* Primers FEx16 606 für den Patienten H 5, Sequenz des *reversed* Primers RExon 16 II für den Patienten H 5, Sequenz des *forward* Primers 719F für den Patienten H 13, Sequenz des *reversed* Primers 719R für den Patienten H 13.

4.3.6 Restriktionsverdau der PCR-Produkte

Typ-II-Restriktionsenzyme spalten DNA an einer spezifischen Stelle innerhalb einer palindromischen Erkennungssequenz. Hier wurden die rekombinant hergestellten Enzyme Msp I und Nla III verwendet (New England Biolabs, Frankfurt a.M.). MspI hat die Erkennungssequenz:

$$5' \dots C \nabla C G G \dots 3'$$
$$3' \dots G G C \blacktriangle C \dots 5'$$

Das Enzym Nla III erkennt und schneidet die DNA an der Stelle:

$$5' \dots C A T G \nabla \dots 3'$$
$$3' \dots \blacktriangle G T A C \dots 5'$$

In einem 50 µl Reaktionsansatz wurden 10 µg PCR-Produkt, 10 u Enzym in dem entsprechenden Reaktionspuffer zusammengefügt und bei 37°C für eine Stunde inkubiert. Die eingesetzte DNA-Menge wurde UV-spektrometrisch bestimmt (Abschnitt 4.3.2). Für Msp I wurde 10 x NEBuffer 2, für Nla III NEBuffer 4 benutzt. Für die Nla III Reaktion wurde zusätzlich 100 µg/ml BSA benötigt. Der Verdau wurde durch 20-minütiges Erhitzen auf 65°C beendet.

4.3.7 Auftrennung von DNA mit Agarosegelelektrophorese

Die Fragmente aus PCR sowie Restriktionsverdau wurden mit Agarosegelelektrophorese nach ihrer Größe getrennt. Für die Fragmente von 200 bis 500 bp wurde ein 2 prozentiges Agarosegel (Sigma, Taufkirchen), für die schärfere und bessere Auftrennung von kleinen Fragmenten (80 bis 400 bp) wurde ein 2,5 prozentiges Gel aus MetaPhor Agarose (FMC Bioproducts, Rockland, USA) oder ein 3,5 prozentiges Gel aus NuSieve 3:1 Agarose (FMC Bioproducts, Rockland, USA) benutzt. Als Elektrophoresepuffer wurde TBE gewählt, da er besonders zur Auflösung kleiner DNA-Fragmente geeignet ist.

Die jeweilige Agarosemenge wurde in TBE-Puffer (5 x Konzentrat: 445 mM TRIS, 445 mM Borsäure, 10 mM EDTA) suspendiert und in einer Mikrowelle gelöst. Kurz vor dem Erstarren wurde die Lösung mit 0,01 % Ethidiumbromid versetzt und auf einen Gelträger gegossen. Das erstarrte Gel wurde in eine Minigel Apparatur (Biometra Göttingen) überführt und mit TBE-Puffer überschichtet. Die Proben wurden mit einem sechsfach konzentrierten Probenpuffer (15 % Ficoll Typ 400, 0,25 % Bromphenolblau) versetzt und in die Geltaschen pipettiert, parallel wurde ein Größen- und Mengenstandard

(Low DNA Mass Ladder, Life Technologies, Karlsruhe) aufgetragen. Die angelegte Spannung betrug 6 V/cm. Der Lauf wurde beendet, wenn die Front des Bromphenolblaus 2/3 der Gellänge überschritten hatte.

4.3.8 Densitometrische Auswertung der Agarosegele

Nach der Elektrophorese wurden die Agarosegele auf einen UV-Transilluminator gelegt und mit dem Alpha Imager (Biozym Diagnostik, Hessisch Oldendorf) abgefilmt. Die Bilder konnten anschließend mit der Gel-Pro Analyzer Software (Media Cybernetics, Maryland, USA) dokumentiert und ausgewertet werden.

5 Ergebnisse

5.1 Quantifizierung des Anteils mutierter an der Gesamt- β -MHC

In Biopsien von heterozygoten FHC-Patienten sollte der Anteil mutierter an der Gesamt- β -MHC ermittelt werden. Es wurden Biopsien mit den Mutationen Gly 584 \rightarrow Arg und Arg 719 \rightarrow Trp analysiert.

Nach Extraktion aus den Biopsien wurde das Myosin mit der spezifischen Endoproteinase Lys-C verdaut. Vor der Quantifizierung mussten die wildtyp und mutierten Peptide in den 200 Verdaufragmenten identifiziert werden.

Ein Peptid wird in der HPLC im ersten Schritt über die Bestimmung der Retentionszeit aufgelöster Peaks identifiziert. Das Erscheinen eines einzelnen Peaks in einem Chromatogramm bedeutet noch nicht, dass es sich um ein einzelnes Peptid handelt. Der Nachweis, dass ein Peak nur von einem Peptid gebildet wird bzw. die Auftrennung der Peaks in einzelne Peptide, muss mit noch mindestens einer weiteren Methode erfolgen. Hierzu zählt die Auftrennung der als rein vermuteten Substanz auf einem anderen Phasensystem (andere Säule und/oder anderes Laufmittel, Kapillarelektrophorese). Alternativ kann das Peptid mit einer anderen physikalisch-chemischen Methode, wie Massenspektrometrie, identifiziert werden. Weiterhin werden Substanzen bei einer qualitativen HPLC-Analyse durch Vergleich mit Reinsubstanzen identifiziert. Haben zwei Stoffe die gleiche Retentionszeit, können sie von gleicher Natur sein. Bei Zugabe dieser Vergleichssubstanz zur Probe und erneuter Chromatographie darf der gesuchte Peak nur höher werden. Es darf sich keine Schulter ausbilden. Werden dann die äußeren Bedingungen geändert, und der Peak trennt sich immer noch nicht auf, ist die Wahrscheinlichkeit sehr hoch, dass es sich um identische Substanzen handelt (Gottwald, 1993).

Die beschriebenen Verfahren wurden kombiniert, um die gesuchten Peptide zu identifizieren. Zuerst wurden die Peptide über die Retentionszeit der Vergleichssubstanz identifiziert. Diese Identifizierung wurde massenspektroskopisch überprüft. Dann wurde mit der Vergleichssubstanz in einer zweiten, von der ersten verschiedenen, Chromatographie koeluiert. Eine Übersicht der dazu notwendigen Experimente zeigt Abbildung 3.2. Die Ergebnisse sind in den Abschnitten 0 bis 5.1.5 dargelegt.

5.1.1 Isolierung und Verdau des Myosins

Isolierung von Myosin aus Faserbündeln

Das Myosin konnte in reiner Form aus Faserbündeln isoliert werden (Abschnitt 4.2.1), wie durch Elektrophorese gezeigt werden konnte. Auf dem Gel in Abbildung 5.1 sind nur die schwere Kette (β -MHC) und die zwei leichten Ketten des Myosins sichtbar. Andere verunreinigende Proteinbanden, wie zum Beispiel die von Aktin oder Tropomyosin, sind nicht sichtbar.

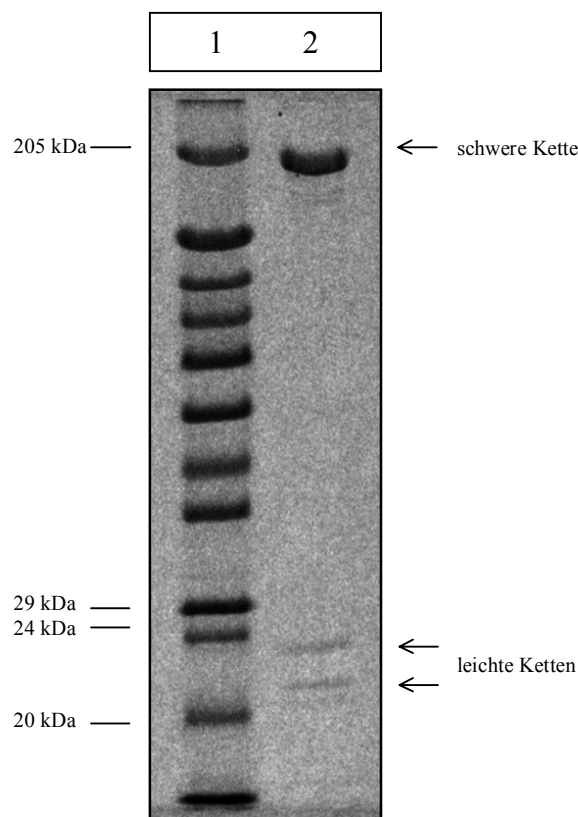


Abbildung 5.1 Isoliertes Myosin auf einem 12,5 %igen Phastgel.

Spur 1: der Molekulargewichtsstandard, Spur 2 isoliertes und gereinigtes Myosin. Die Abwesenheit anderer Proteinbanden zeigt, dass das isolierte Myosin rein ist.

Verdau des Myosins mit Endoproteinase Lys-C

Für die Fragmentierung des Myosinmoleküls wurde das hochspezifische Enzym Lys-C ausgewählt, das Verdaufragmente geeigneter Größe erzeugte, bei denen die Mutation mittig platziert war.

Da die Patienten heterozygot für FHC sind, ist auf einem Allel das mutierte und auf dem anderen das wildtyp Protein kodiert. Das isolierte Myosin ist also eine Mischung aus mutiertem und wildtyp Protein. Durch den Verdau entstanden zwei gleich geartete Stücke, die sich nur in einer Aminosäure unterscheiden. Dieser Aminosäureaustausch macht eine Unterscheidung durch die veränderten physiko-chemischen Eigenschaften möglich. Dafür war es günstig, dass die Mutation in der Mitte eines Verdaufragmentes lag und nicht die Zerstörung oder Erzeugung einer Spaltstelle herbeiführte. Durch den Verdau sollten gleich lange Peptide erhalten werden. Die UV-Absorption gleich langer Peptide im Wellenlängenbereich von 200 nm bis 220 nm, in dem die Peptidbindungen absorbieren, ist nur noch proportional zur Peptid-Menge. Auf diese Weise konnten die Peptide durch ihre Absorption bei 200 nm und 215 nm quantifiziert werden. Die unterschiedliche Absorption der wildtyp und mutierten Peptide bei 200 nm und 215 nm wurde hierbei beachtet (siehe Abschnitt 4.2.4).

Das Massenspektrometer konnte m/z-Werte bis 2400 amu aufzeichnen. Die verwendete ESI-Ionisationsmethode erzeugte bevorzugt mehrfach geladene Ionen. Die durch den Verdau erzeugten Peptide von ungefähr 3000 Da und 4000 Da waren daher gut zu analysieren.

Für jeden Verdauansatz wurde die Myosinmenge eingesetzt, die aus einem Faserbündel erhalten wurde. Durch die verschieden großen Bündel konnte die isolierte Myosinmenge variieren. Günstigerweise besitzt das Enzym Lys-C einen relativ großen Toleranzbereich bezüglich des eingesetzten Verhältnisses von Enzymmenge zu Substrat. Die Enzymmenge kann von 1/100 bis 1/20 der Proteinmenge betragen. Zur Sicherheit wurde die Vollständigkeit des Verdaus mit LC/MS Analyse überprüft. Zeigten sich in der LC/MS-Analyse ungewöhnlich große Fragmente, wurde der Ansatz ein weiteres Mal für 24 Stunden mit Lys-C verdaut. In der folgenden Analyse wurde somit optimal verdautes Myosin eingesetzt.

5.1.2 Überprüfung der synthetischen Peptide als Vergleichssubstanzen

Da die gesuchten wildtyp und mutierten Verdaufragmente über Retentionszeitvergleich und Koelution mit synthetischen Peptiden als Vergleichssubstanzen identifiziert wurden, war es von großer Bedeutung, die Richtigkeit ihrer Sequenz und deren Absorptionseigenschaften zu überprüfen.

Sequenzierung der synthetischen Peptide

Die Sequenz der verwendeten synthetischen Peptide wurde mit massenspektroskopischer Sequenzierung verifiziert. Zusätzlich wurde in Proteindatenbanken mit dem BLAST-Programm überprüft, dass die Sequenz und die Masse der gesuchten Peptide nur charakteristisch für die β -MCH sind. So konnte ausgeschlossen werden, dass Kontaminationen des Myosins zu falschen Ergebnissen führen. Dies könnte geschehen, falls bei der Extraktion des Myosins aus den Faserbündeln doch andere Peptide mit gleichen Massen herausgelöst wurden.

Dies war von besonderer Bedeutung bei dem schwer betroffenen Patienten H 13 (Arg 719 \rightarrow Trp), da es in dessen Gewebe möglicherweise zu Regenerationsprozessen in der Muskulatur mit anderen Fasertypen gekommen sein könnte. Aus diesen anderen Proteinen könnte durch Verdau ein Peptid mit der gleichen Masse wie der gesuchten entstehen.

UV-Spektrometrische Vermessung

Ein Aminosäureaustausch kann die Absorptionseigenschaften von Peptiden verändern. Es wäre möglich, dass trotz gleicher Länge und gleicher eingesetzter Menge wildtyp und mutiertes Peptide unterschiedlich stark absorbieren. Für die abschließende Quantifizierung wurde daher die UV-Absorption bei den in der CE (200 nm) und HPLC (215 nm) verwendeten Wellenlängen festgestellt.

Die UV-spektrometrische Vermessung der synthetischen Peptide für die Gly 584 \rightarrow Arg Mutation ergab eine unterschiedlich starke Absorption bei 200 nm. Der für das wildtyp Peptid in der CE erhaltene Absorptionswert musste daher mit dem Faktor 1,12 multipliziert werden.

Die synthetischen Peptide für Versuche mit der Arg 719 → Trp Mutation zeigten bei 215 nm eine stark unterschiedliche Absorption. Die HPLC-Absorptionswerte des wildtyp Peptids mussten stets mit dem Faktor 1,8 multipliziert werden.

5.1.3 Bestimmung des Anteils mutierter an der Gesamt-β-MHC in Muskelfaserbündeln des Patienten H 2 mit der Gly 584 → Arg Mutation

Nach dem unerwarteten Ergebnis, dass der Anteil an mutiertem Myosin einer Patientenprobe mit der Val 606 → Met Mutation nur 12 Prozent (Nier et al., 1999) und nicht wie allgemein angenommen 50 Prozent betrug, sollte mit der gleichen Methode eine Probe mit der ebenfalls als gutartig bezeichneten Gly 584 → Arg Mutation untersucht werden.

Die HPLC-Auftrennung des Myosinverdaus (Abbildung 5.2) zeigt das typische Muster eines tryptischen Verdaus, bei dem die vielen Peptide einen Peakhügel bilden. In diesem ersten Chromatographieschritt wurde noch keine Einzelpeaktrennung erreicht.

Zur Identifizierung der HPLC-Fractionen, die wildtyp und mutiertes Verdaufragment enthielten, wurden die analogen synthetischen Peptide unter gleichen Bedingungen aufgetrennt. Auf diese Weise wurden die Fraktionen 54 und 55 identifiziert (Abbildung 5.3).

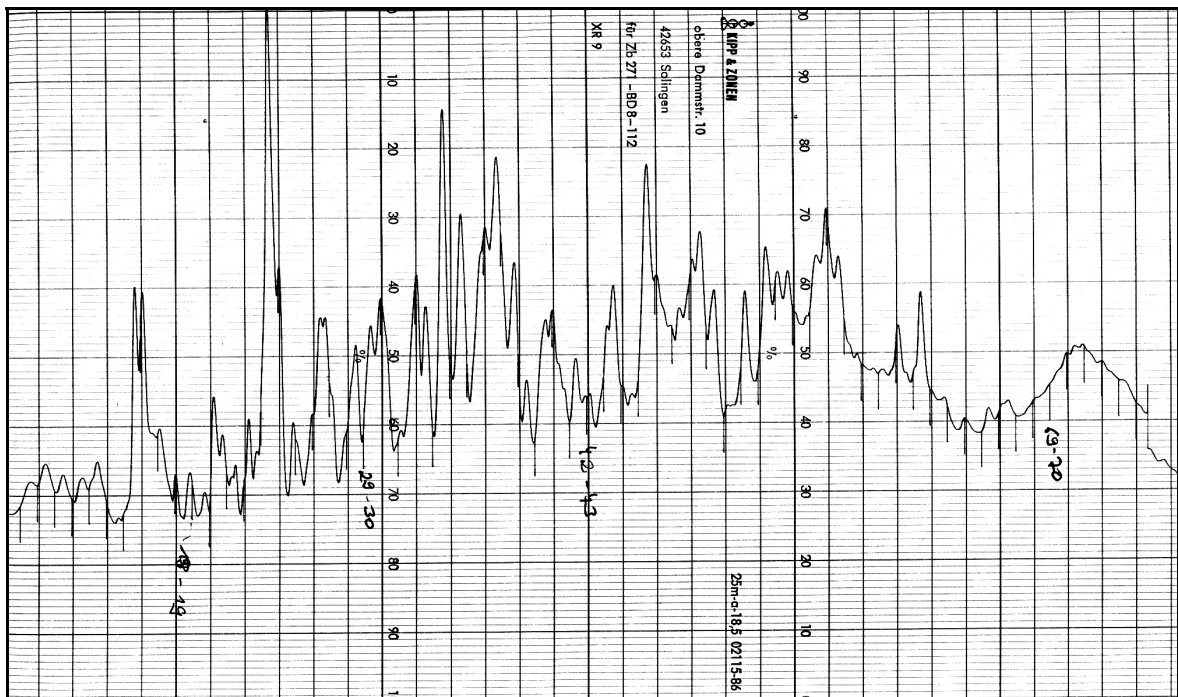


Abbildung 5.2 HPLC-Spektrum eines Myosinverdaus einer Probe des Patienten H 2 (Gly 584 → Arg).

HPLC-Spektrum eines Lys-C-Verdaus von Myosin aus Muskelfasern des Patienten H 2 mit der Gly 584 → Arg Mutation. Die ungefähr 200 Peptide des Verdaus ergeben das typische Auftrennungsmuster eines tryptischen Verdaus, bei dem keine Einzelpeaktrennung erreicht wurde.

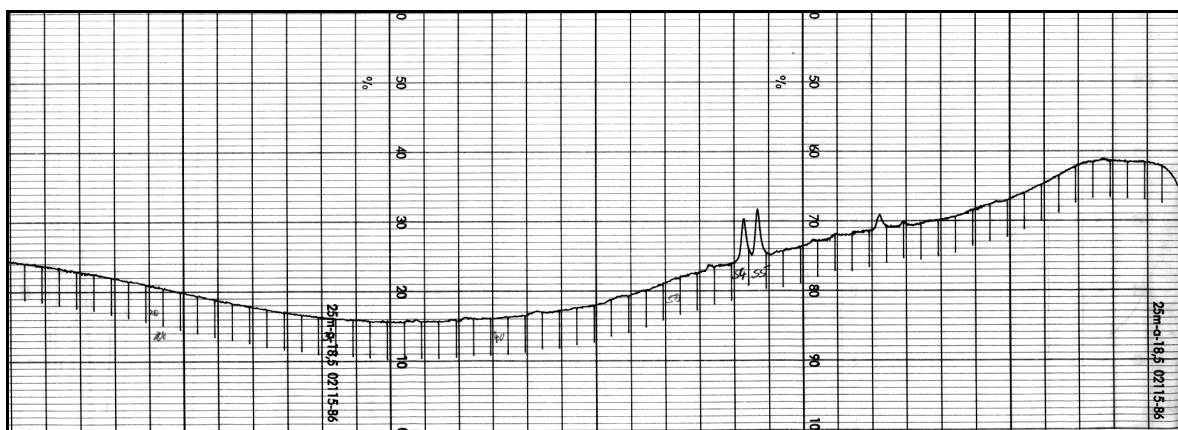
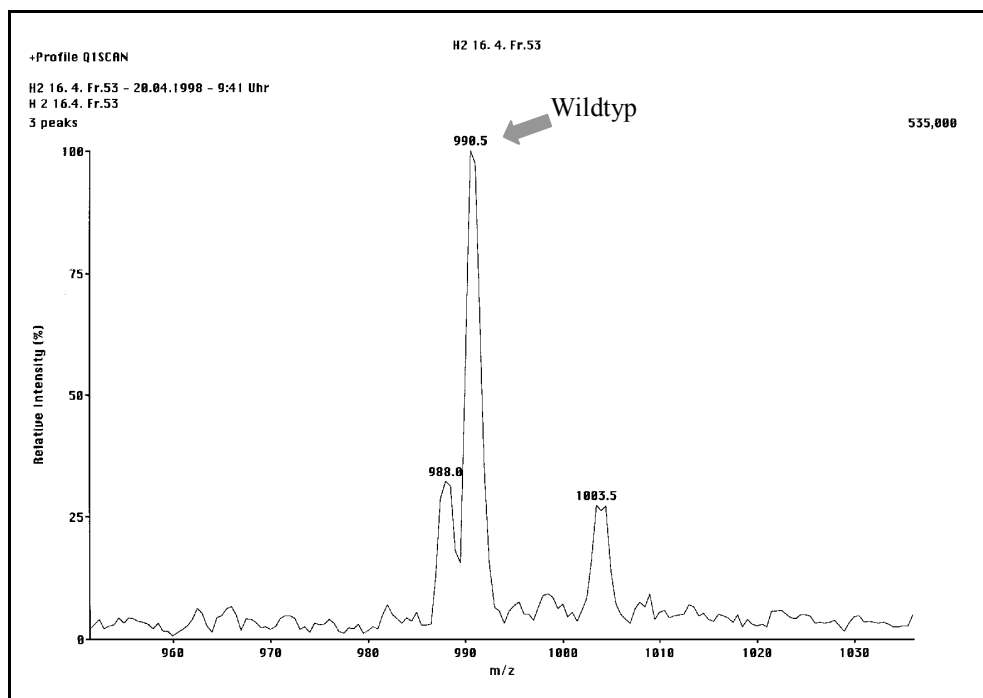


Abbildung 5.3 HPLC-Spektrum der synthetischen Peptide Gly 584 und Gly 584 → Arg.

Die Peptide eluieren hier in den Fraktionen 54 und 55. Die Fraktionen in diesem Retentionszeitbereich und die benachbarten Fraktionen, wurden aus der Auftrennung des Myosinverdaus ausgewählt.

Zur Überprüfung der Identifizierungsmethode wurden die Fraktionen in diesem Bereich der Retentionszeit nochmals massenspektroskopisch vermessen (Abbildung 5.4). Es wurden die dreifach geladenen Ionen des wildtyp Peptids mit $m/z = 991$ und die dreifach geladenen Ionen des mutierten Peptids mit $m/z = 1024$ in den Fraktionen 53 bis 55 gefunden. Dies zeigt, dass die Retentionszeiten der synthetischen Peptide eine eindeutige Identifizierung der gesuchten Fraktionen ermöglichten.



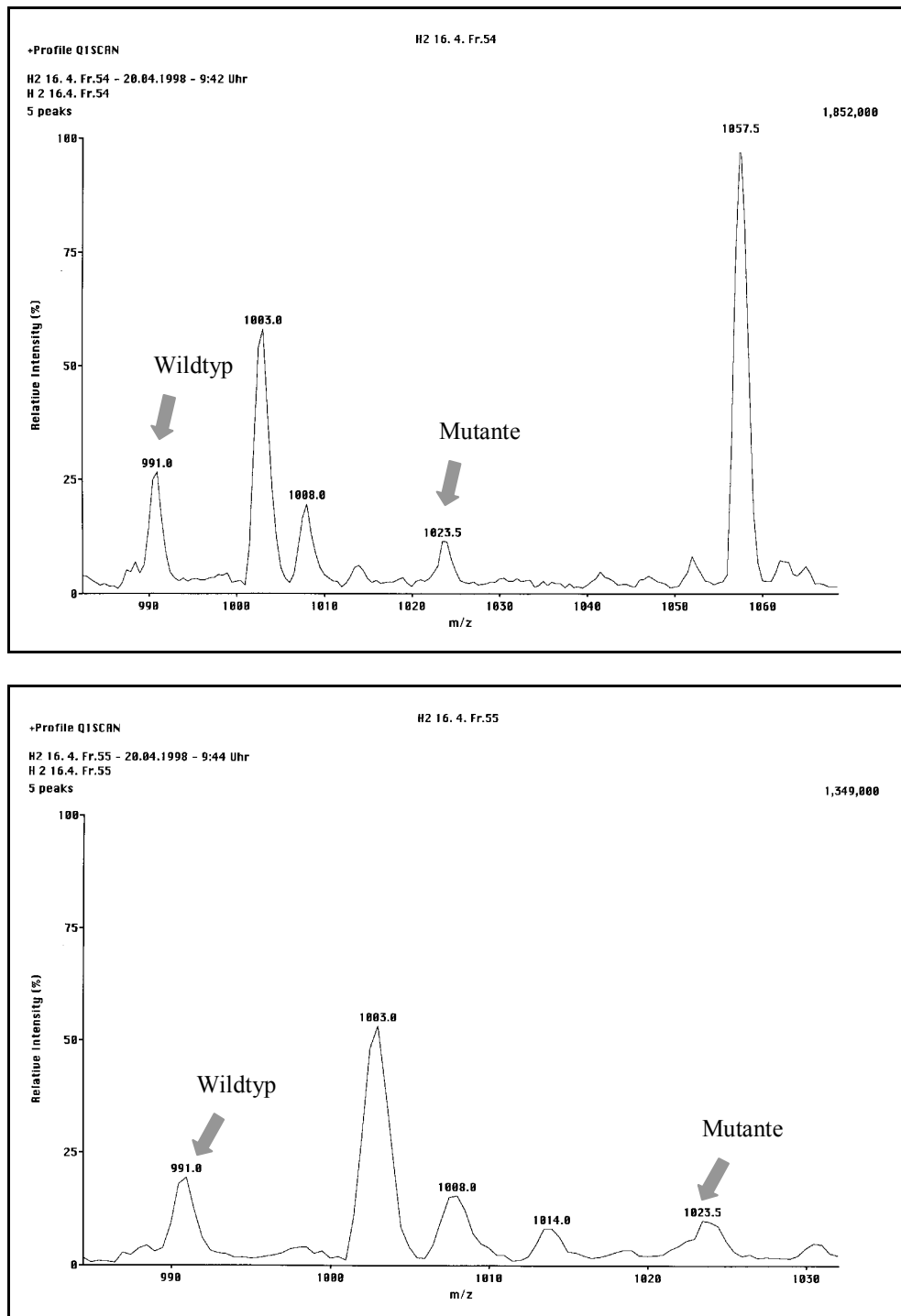


Abbildung 5.4 Massenspektren der ausgewählten HPLC-Fraktionen.

Massenspektren der HPLC-Fraktionen 53 (oben), 54 (mitte) und 55 (unten). In diesen Fraktionen wurden das mutierte und wildtyp Peptid massenspektroskopisch identifiziert. Fraktion 53 enthält das dreifach geladene wildtyp Peptid ($m/z = 991$). In den Fraktionen 54 und 55 sind die dreifach geladenen Peptide von Wildtyp ($m/z = 991$) und Mutante ($m/z = 1024$) sichtbar.

Für den zweiten Chromatographieschritt wurden die Fraktionen 53, 54 und 55 zusammengeführt und Aliquots davon über Kapillarelektrophorese aufgetrennt. In den zusammengeführten Fraktionen waren mehr als die gesuchten Peptide enthalten, aber durch Vergleich mit den Retentionszeiten der synthetischen Peptide konnten die entsprechenden Peaks (siehe Abbildung 5.5) ungefähr ermittelt werden.

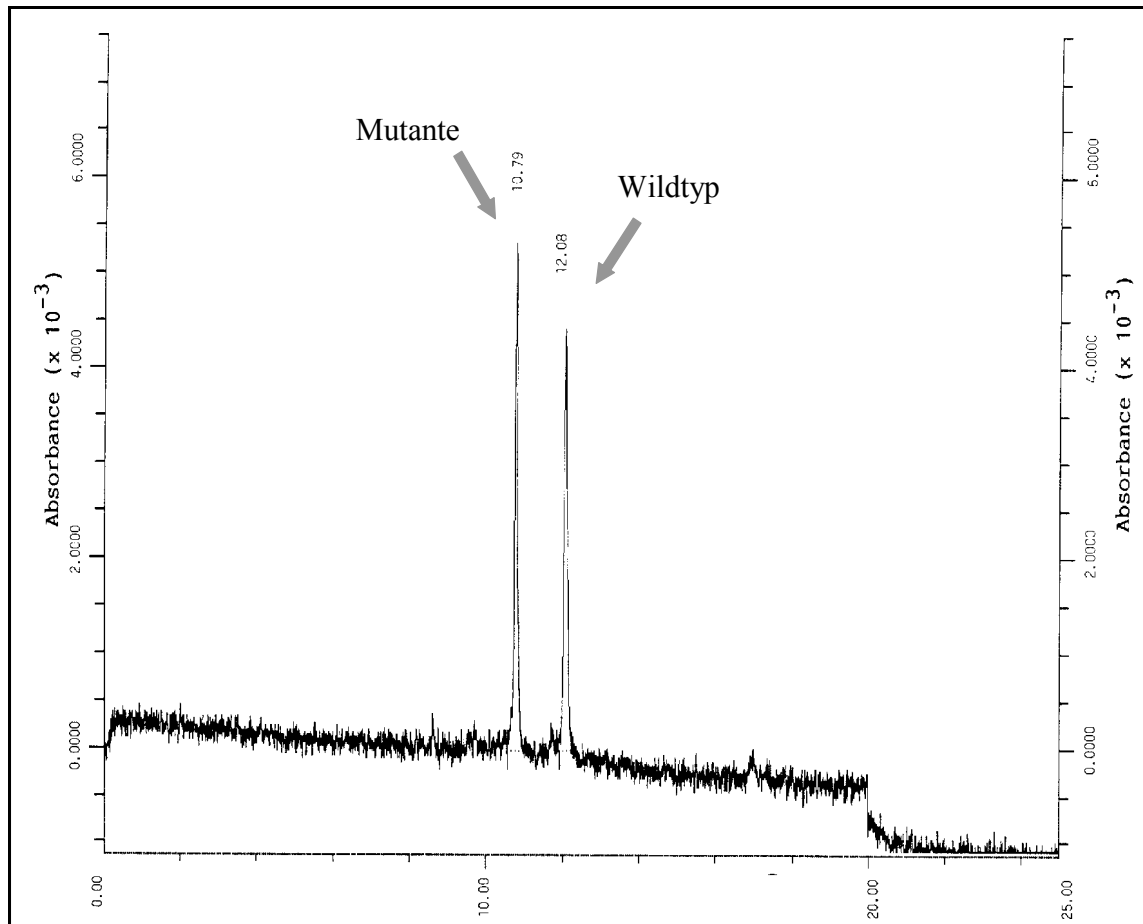


Abbildung 5.5 CE-Spektrum der synthetischen Peptide Gly 584 und Gly 584 → Arg.

Anhand der Retentionszeiten im CE-Spektrum konnten die entsprechenden Peptide in den zusammengeführten HPLC-Fractionen identifiziert werden, die auf gleiche Weise auf der CE aufgetrennt wurden.

Mit der gleichen Auftrennungsmethode wurde dann ein Aliquot der zusammengeführten HPLC-Fractionen vermessen (Abbildung 5.6). Der Peak bei 12,14 Minuten sollte entsprechend der ermittelten Retentionszeiten aus Abbildung 5.5 dem wildtyp Fragment entsprechen, ein Peak des Triplets bei 10,8 Minuten das mutierte Fragment enthalten. Das wildtyp Fragment konnte eindeutig durch Koelution mit synthetischen wildtyp Peptid

(siehe Abbildung 5.7) identifiziert werden. Da die Menge der zugegebenen synthetischen Mutante zu groß war, wurden zwei Peaks des Triplets bei 10,8 Minuten überlagert, so dass mit diesem Chromatogramm keine eindeutige Identifizierung möglich war.

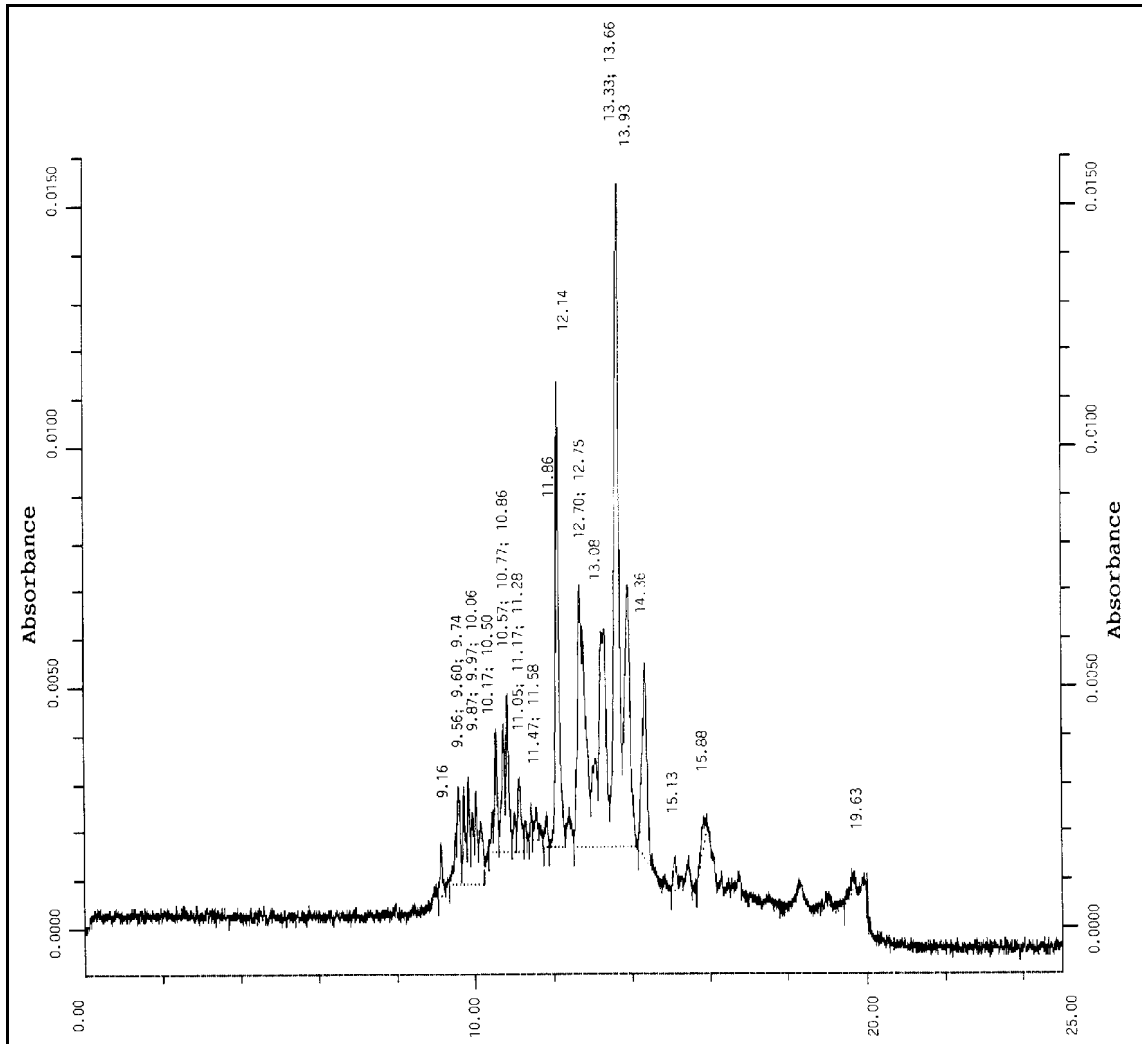


Abbildung 5.6 CE-Spektrum der Peptide aus den zusammengeführten HPLC-Fractionen.

Der Peak bei 12,14 Minuten sollte entsprechend der Retentionszeit des synthetischen Peptids der Wildtyp-Peak sein (Abbildung 5.5) Eine eindeutige Identifizierung der Mutante ist noch nicht möglich, sie sollte jedoch im Bereich von 10,8 Minuten eluiert sein.

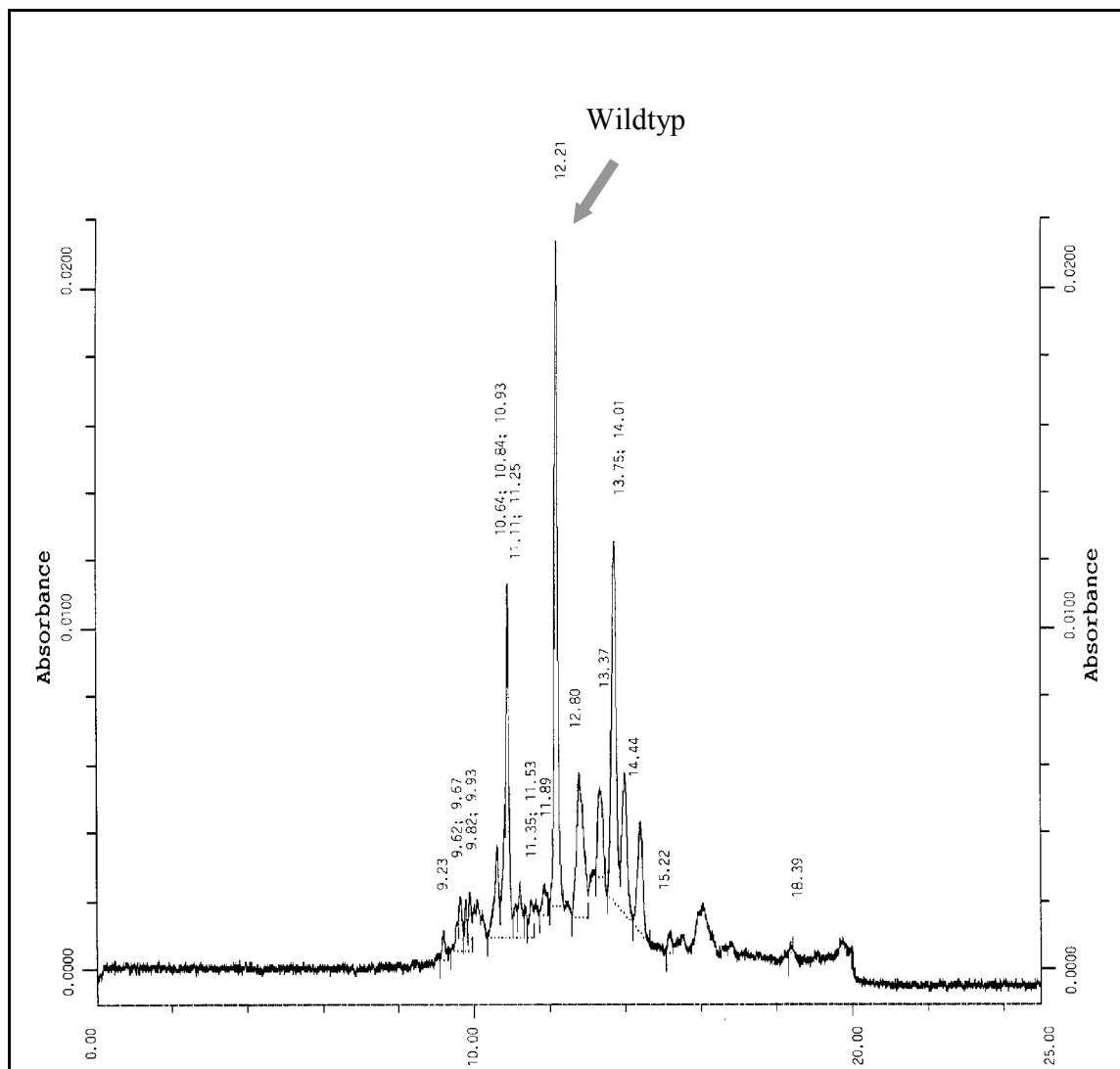


Abbildung 5.7 Koelution der zusammengeführten Fraktionen mit den synthetischen Peptiden.

CE-Spektren der zusammengeführten HPLC-Fractionen, versetzt mit synthetischem wildtyp Peptid Gly 584 und mutiertem Peptid Gly 584 → Arg. Der Peak bei 12,21 Minuten wurde durch das synthetische wildtyp Peptid erhöht. Durch den Zusatz des synthetischen mutierten Peptids kam es zu einer Überlagerung mit einem anderen Peak (bei 10,84 und 10,94 Minuten), so dass in diesem Spektrum noch keine eindeutige Identifizierung der Mutante möglich war.

Zur Identifikation des Peaks mit dem mutiertem Peptid wurde nochmals ein Aliquot der zusammengeführten Fraktionen aufgetrennt (Abbildung 5.8). Nach Koelution mit synthetischer Mutante (Abbildung 5.9) wurde der dritte Peak des Triplets (9,36, 9,5 und 9,61 Minuten) aus Abbildung 5.8 mit der Retentionszeit von 9,61 Minuten als Mutante identifiziert. Dies entspricht dem Peak bei 10,86 Minuten in Abbildung 5.6.

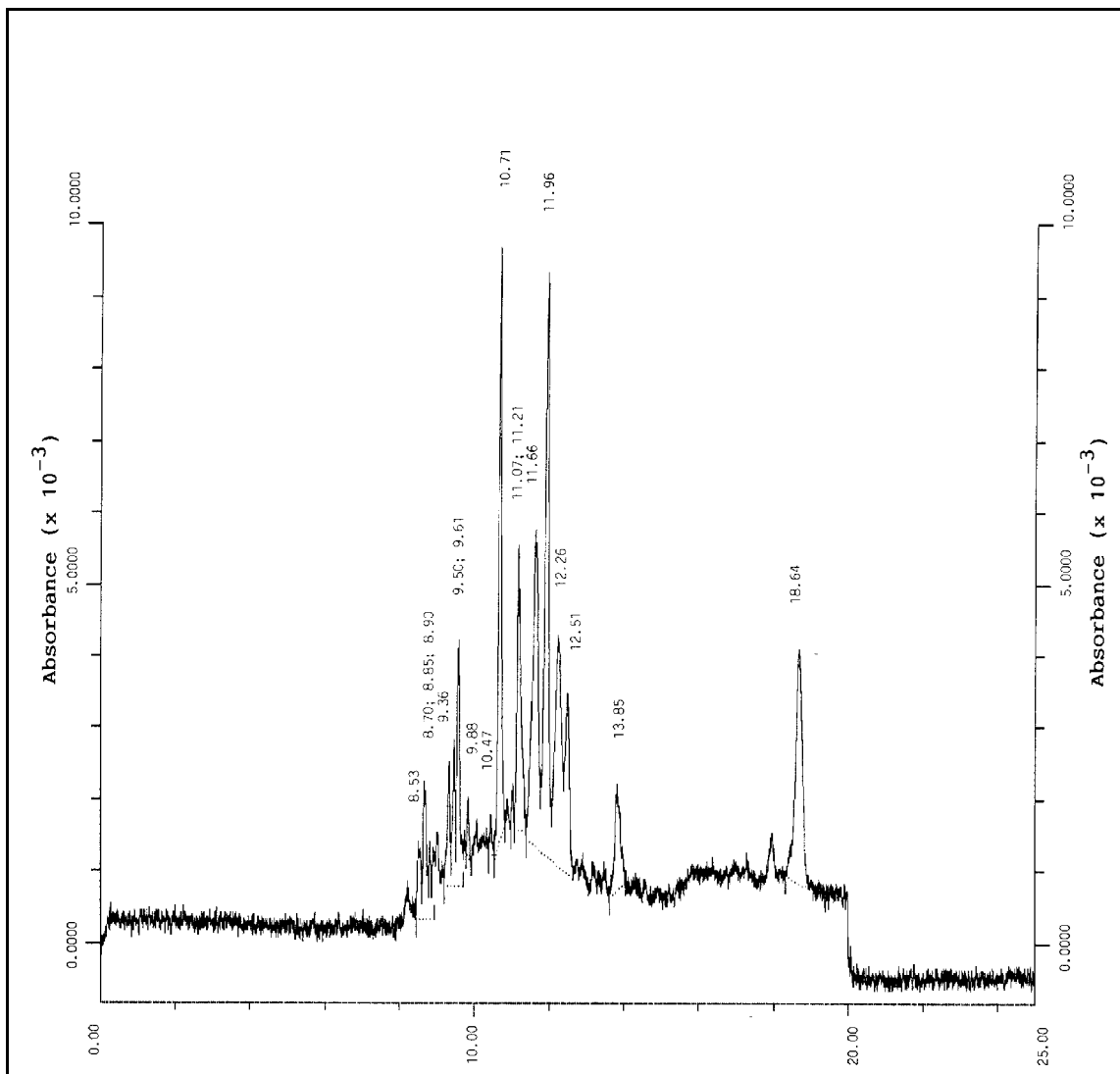


Abbildung 5.8 Zweites CE-Spektrum der Peptide aus den zusammengeführten HPLC-Fractionen.

Zur Identifizierung des mutierten Peptids wurde nochmals ein CE-Spektrum der zusammengeführten HPLC-Fractionen aufgezeichnet. Analog des Auftrennungsmusters in Abbildung 5.6, sollte einer der Peaks bei 9,36, 9,5 oder 9,61 Minuten das mutierte Peptid darstellen.

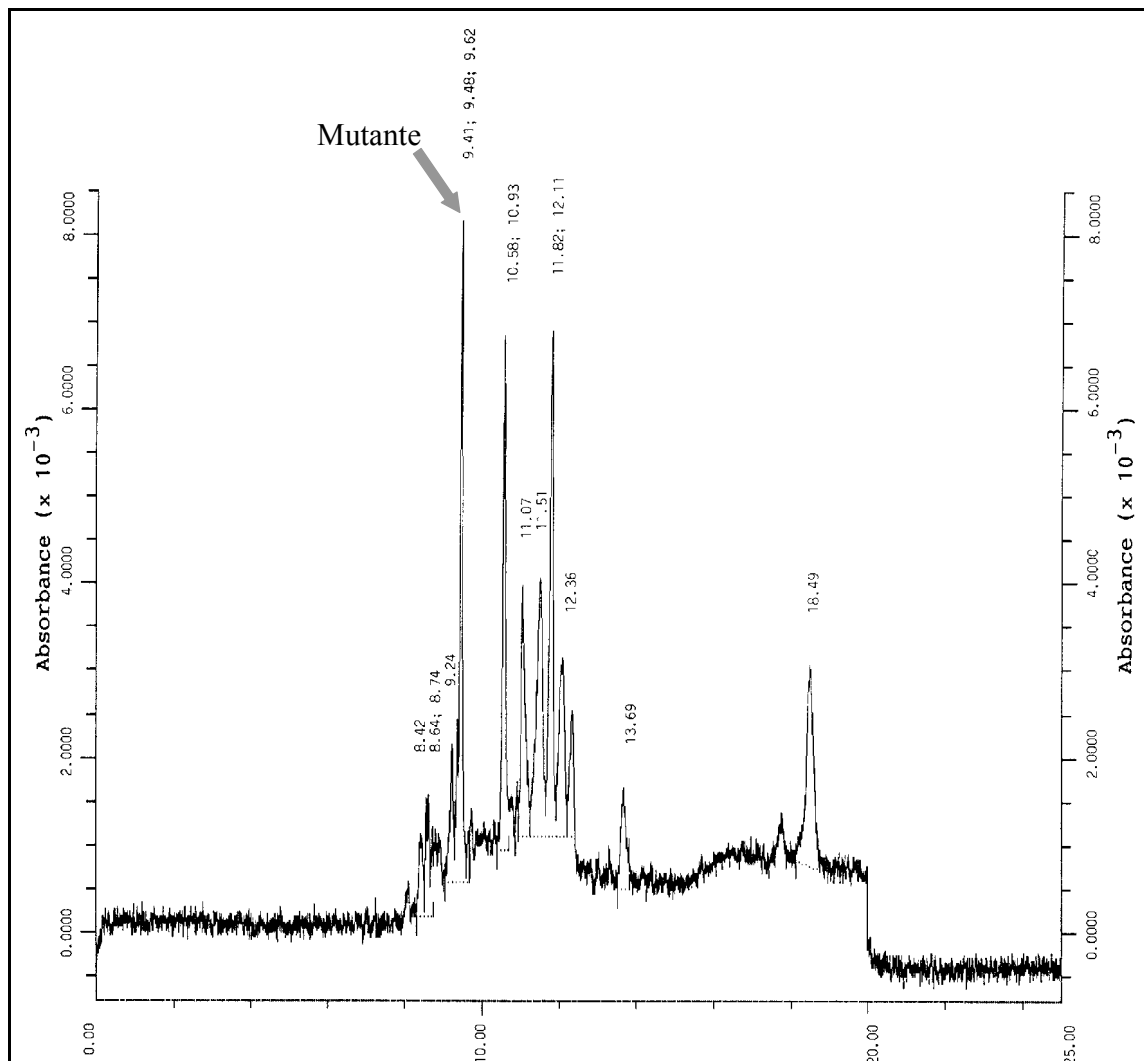


Abbildung 5.9 Koelution der zusammengeführten Fraktionen mit der synthetischen Mutante.

CE-Spektren der zusammengeführten HPLC-Fractionen (Abbildung 5.8), versetzt mit synthetischem mutiertem Peptid. Der Peak bei 9,48 Minuten wurde durch Zusatz des synthetischen Peptids erhöht und entspricht damit dem mutierten Peptid. Dieser Peak entspricht dem dritten Peak der indizierten Triplets, 9,61 Minuten in Abbildung 5.8 und 10,86 Minuten in Abbildung 5.6.

Es wurden also der Peak bei 12,14 Minuten als wildtyp Peptid und der Peak bei 10,86 Minuten als Mutante (Abbildung 5.6) eindeutig durch Koelution identifiziert.

Das Verhältnis von wildtyp zu mutiertem Myosin wurde ermittelt, indem die Flächen der Peaks von Wildtyp und Mutante aus Abbildung 5.6 ins Verhältnis gesetzt wurden. Wie in Abbildung 5.6 zu sehen, wurde eine horizontale Basislinie gelegt. Auf die gleiche Weise wurde bei der Auswertung aller weiteren Messwerte verfahren. Des Weiteren wurden die in der CE ermittelten Absorptionen des Wildtyps mit dem Faktor 1,12 multipliziert (5.1.2). Die Auswertung von Versuchen mit vier Faserbündeln eines Patienten mit der

Gly 584 → Arg Mutation ergab einen Anteil von 20,1 % (+/- 0,6 % sd) mutierter an der Gesamt-β-MHC.

Damit wurde jetzt in zwei FHC-Patientenproben mit mildem Phänotyp ein relativ geringer Gehalt an mutiertem Myosin gefunden: Für einen Patienten mit der Val 606 → Met Mutation wurden 12 Prozent, für einen Patienten mit der Gly 584 → Arg Mutation 20 Prozent mutiertes Myosin (siehe oben) ermittelt (Nier et al., 1999). Dies war überraschend, da für einen heterozygoten Träger einer autosomal dominanten Krankheit ein Verhältnis von 50 Prozent wildtyp zu 50 Prozent mutiertem Protein erwartet wurde (Kapitel 2.4).

5.1.4 Bestimmung des Anteils mutierter an der Gesamt-β-MHC in Muskelfaserbündeln des Patienten H 13 mit der Arg 719 → Trp Mutation

Nach den relativ geringen und unterschiedlichen Gehalten an mutiertem Myosin in Proben wenig betroffener FHC-Patienten, wurde im nächsten Schritt Biopsiematerial eines klinisch schwer betroffenen Patienten mit der Arg 719 → Trp Mutation untersucht.

Für die Quantifizierung des H 13 (Arg 719 → Trp) Biopsiematerials wurde ein anderes Lys-C-Verdaufragment als für den Patienten H 2 (Gly 584 → Arg) untersucht, da sich die untersuchte Mutation in einem anderem Fragment befand. Es besaß eine andere Länge und Sequenz (siehe Abbildung 4.1). Es zeigte sich, dass die in 5.1.3 angewandte Methode auf diese Peptide nicht übertragbar war, da sich wildtyp und mutiertes Peptid weder auf der HPLC, noch auf der CE von den anderen Verdaufragmenten trennen ließen. Aus diesem Grund wurde der Versuch einer zweidimensionalen HPLC-Auftrennung mit verschiedenen Säulenmaterialien unternommen (Abschnitt 4.2.6).

Zuerst wurde der Myosinverdau auf einer C4-RP-Säule auf der HPLC fraktioniert (Abbildung 5.10). Mit dem gleichen Protokoll wurden die synthetischen Peptide (Abbildung 5.11) aufgetrennt, um die Fraktionen mit wildtyp und mutiertem Peptid auswählen zu können.

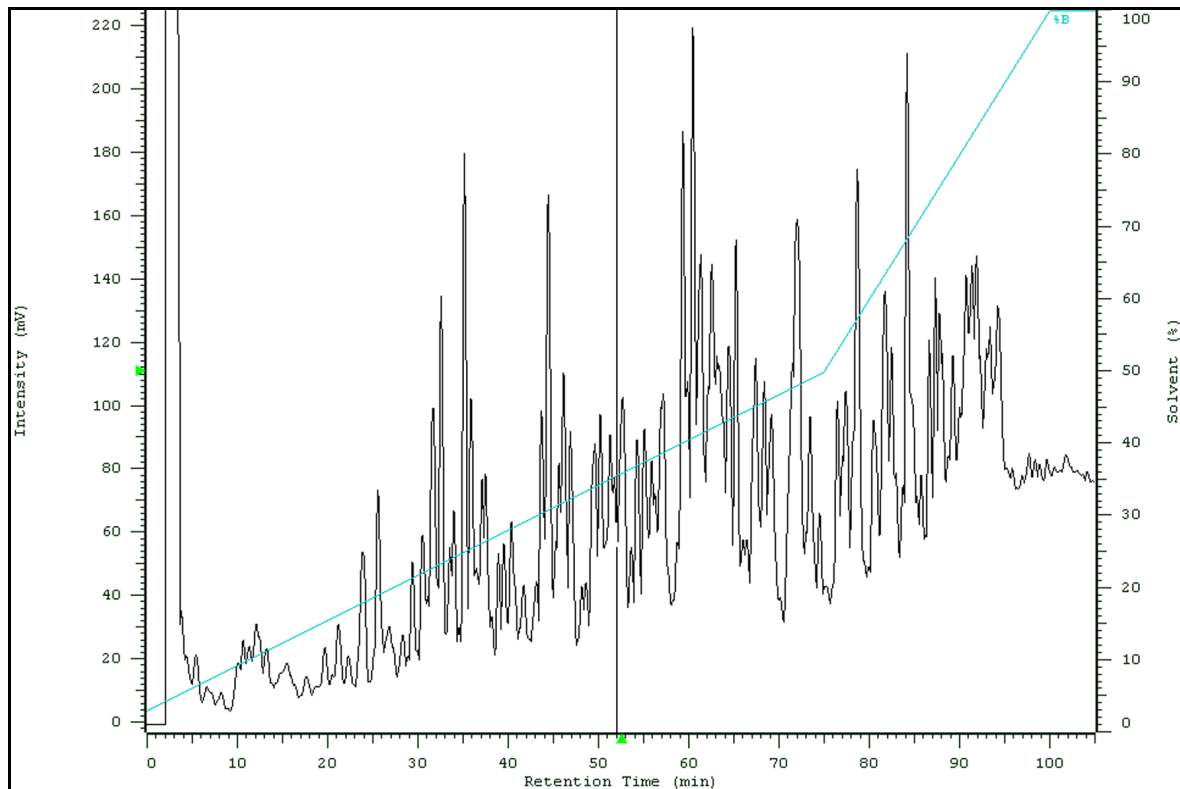


Abbildung 5.10 HPLC-Spektrum eines Myosinverdaus einer Probe des Patienten H 13 (Arg 719 → Trp).

Lys-C-Myosinverdaus aus einem Faserbündel des Patienten H 13 mit der Arg 719 → Trp Mutation. Das Spektrum wird von ungefähr 200 Peptiden gebildet, bei denen überwiegend keine Einzelpeaktrennung vorliegt. Mit dieser Auftrennung fand eine Vorfraktionierung statt.

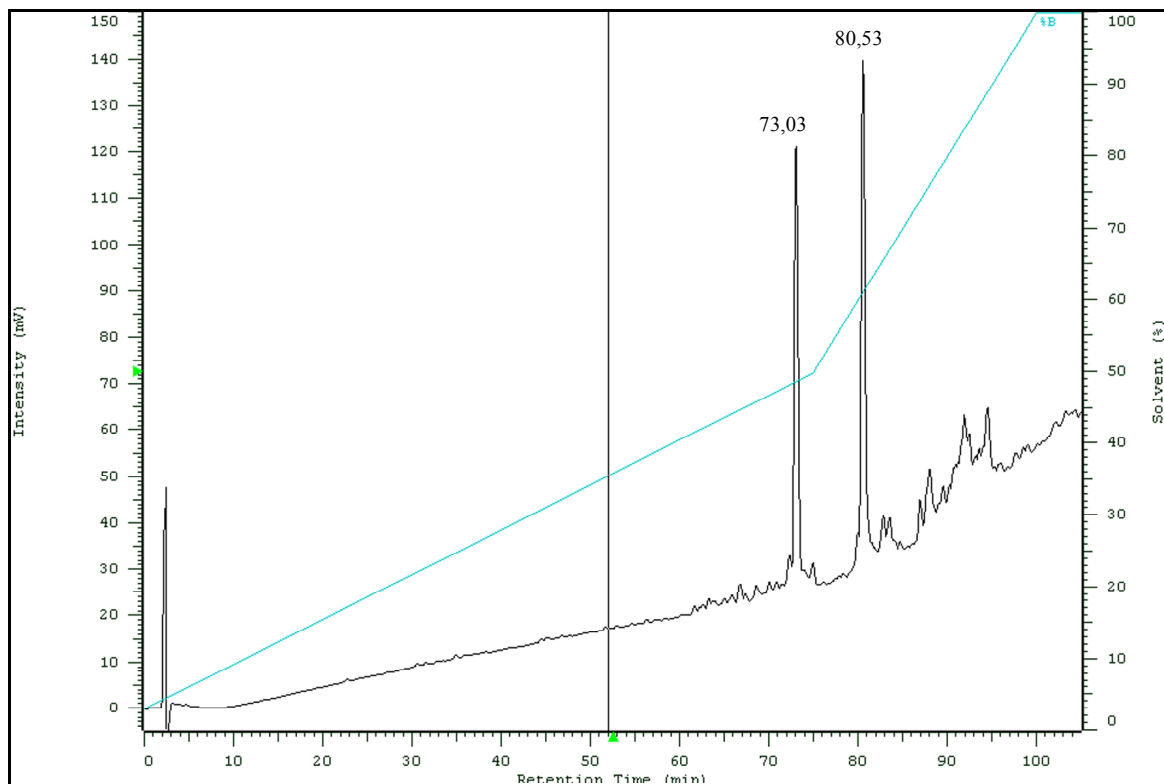
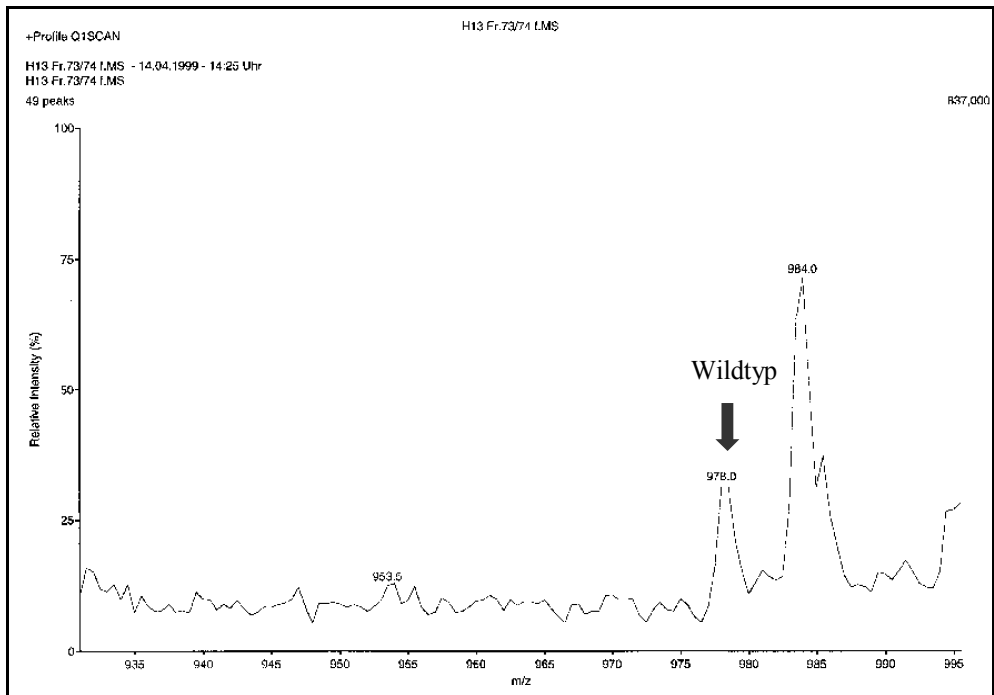
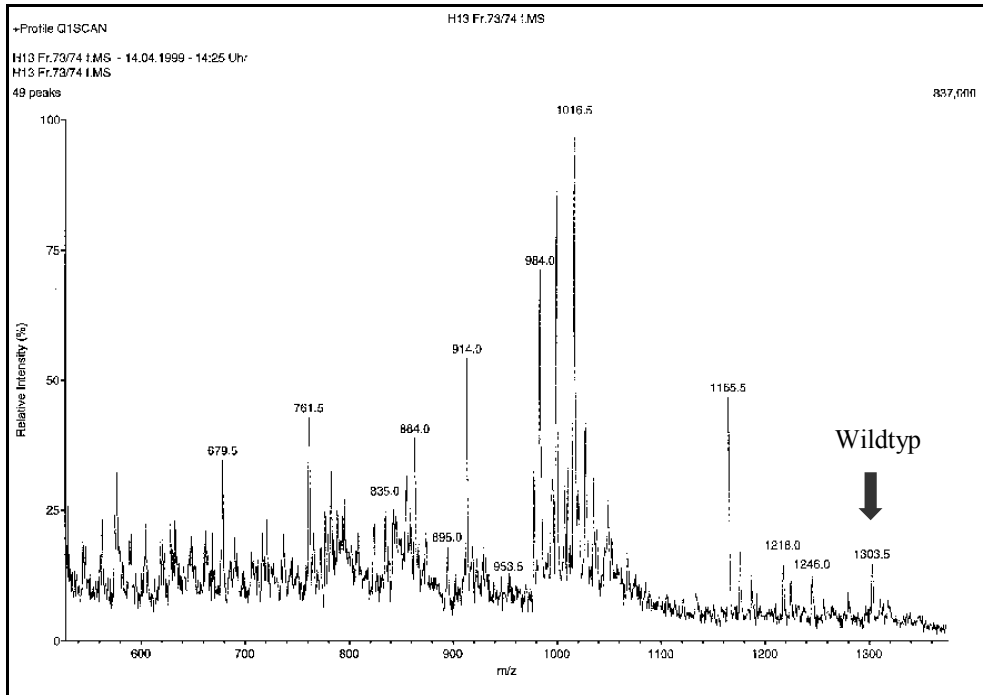


Abbildung 5.11 HPLC-Spektrum der synthetischen Peptide Arg 719 und Arg 719 → Trp.

Anhand der Retentionszeiten der synthetischen Peptide wurden die Fraktionen, die die entsprechenden natürlichen Peptide enthielten aus dem aufgetrennten Myosinverdau ausgewählt und zusammengeführt.

Die über die Retentionszeit der synthetischen Peptide ermittelten Fraktionen wurden massenspektroskopisch nachuntersucht. In den zwei zusammengeführten Fraktionen des Wildtyps konnten die dreifach ($m/z = 1303,5$ gemessen, $m/z = 1304$ erwartet), vierfach ($m/z = 978$ gemessen, $m/z = 978$ erwartet) und fünffach ($m/z = 783$ gemessen, $m/z = 783$ erwartet) geladene Ionen nachgewiesen werden (Abbildung 5.12).



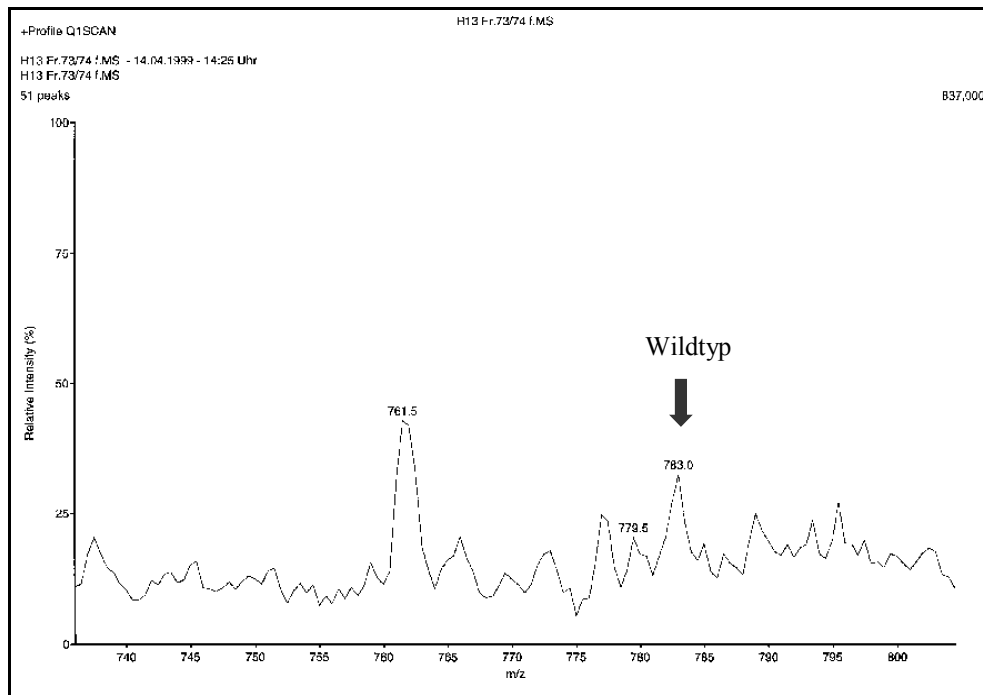


Abbildung 5.12 MS-Spektren der zusammengeführten HPLC-Fractionen mit dem wildtyp Peptid.

Im obersten Bild ist der dreifach geladene Wildtyp-Peak ($m/z = 1303,5$) zu sehen. Das mittlere und untere Bild stellen Vergrößerungen des oberen dar und zeigen die Peaks der vier- ($m/z = 978$) und fünffach ($m/z = 783$) geladenen Ionen.

In den Fraktionen mit dem mutierten Peptid waren die fünffach ($m/z = 787,5$ gemessen, $m/z = 788,9$ erwartet) und sechsfach ($m/z = 658,5$ gemessen, $m/z = 657,6$ erwartet) geladenen Ionen detektierbar. Auch wenn die Abweichung der gemessenen von den erwarteten Massen bei der Mutante höher waren als beim wildtyp Fragment, wurden diese Fraktionen weiterverwendet. Die ermittelten Massen zeigen, dass die Mutante sehr wahrscheinlich in diesen Fraktionen vorhanden ist, zusätzlich wurden diese Fraktionen bereits über die Retentionszeit der entsprechenden synthetischen Peptide vorausgewählt. In der zweiten HPLC-Auftrennung wird diese Auswahl nochmals über die Retentionszeit der synthetischen Peptide und Koelution überprüft, so dass ein eventueller Irrtum bemerkt würde.

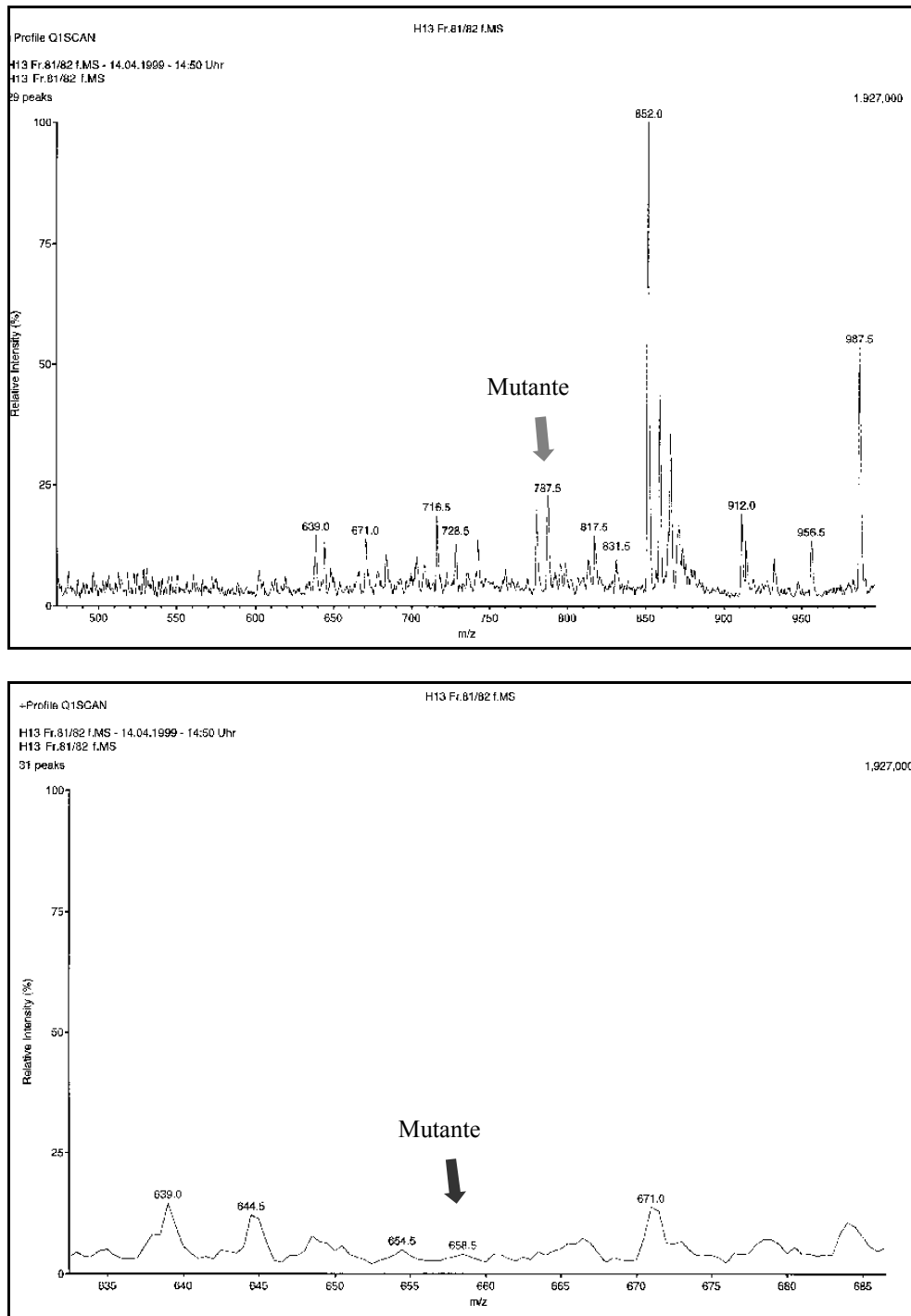


Abbildung 5.13 MS-Spektren der zusammengeführten HPLC-Fractionen mit dem mutierten Peptid.

Oberen: fünffach positiv geladenes Ion ($m/z = 787,5$), unten: sechsfach geladenes Ion ($m/z = 658,5$) des mutierten Peptids.

In der zweiten HPLC-Chromatographie auf einer C18-RP-Säule wurden wieder zuerst die synthetischen Peptide aufgetrennt (Abbildung 5.14). Anhand dieser Retentionszeiten

können in den zusammengeführten Fraktionen die wildtyp und mutierten Peptide identifiziert werden.

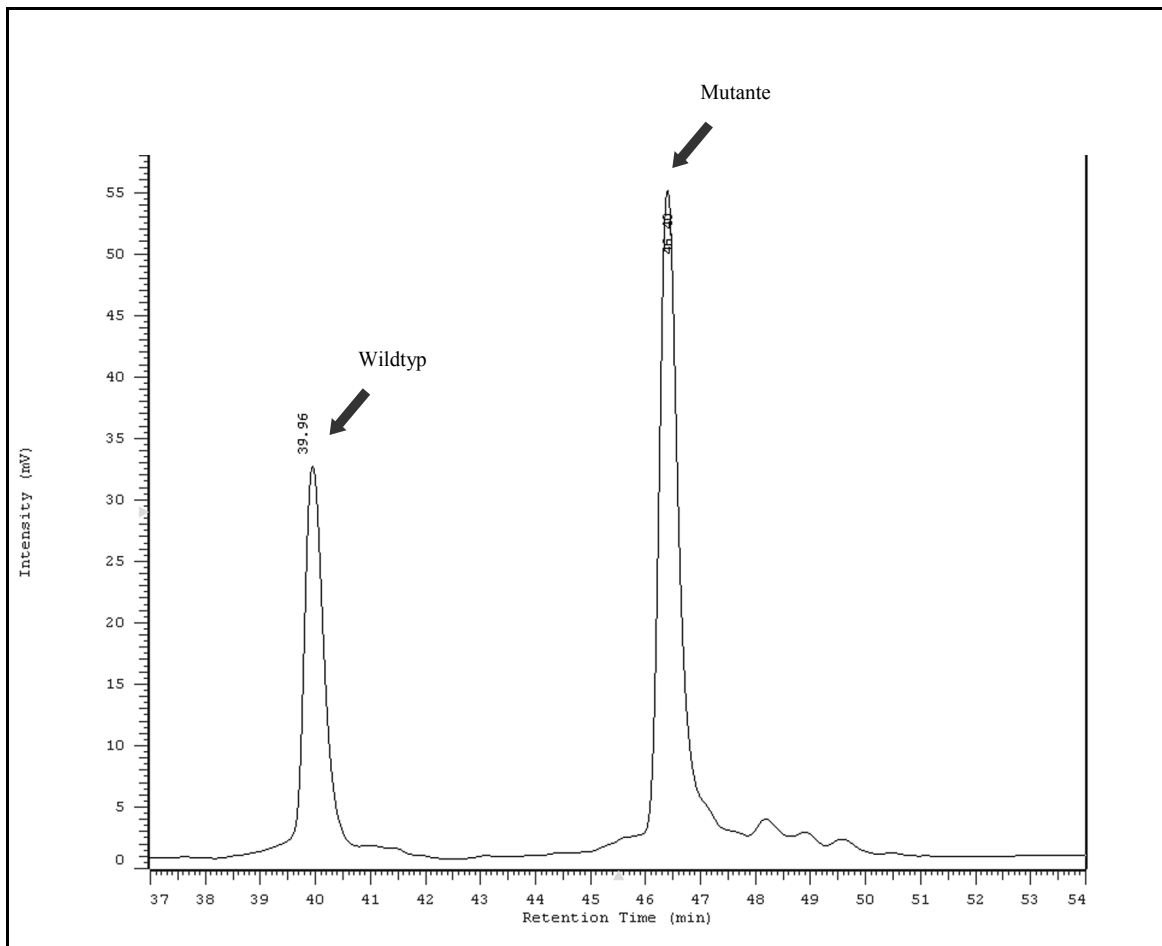


Abbildung 5.14 HPLC-Spektrum der synthetischen Peptide Arg 719 und Arg 719 → Trp.

Auftrennung der synthetischen Peptide in einem zweiten HPLC-Schritt. Anhand der Retentionszeiten wurden die Peaks mit Wildtyp und Mutante in den zusammengeführten HPLC-Fractionen der ersten Auftrennung identifiziert.

Abbildung 5.15 zeigt das Spektrum der vier zusammengeführten Fraktionen der ersten HPLC-Auftrennung, in denen Wildtyp und Mutante identifiziert wurden. Durch Vergleich mit den Retentionszeiten der synthetischen Peptide in Abbildung 5.14 sollte sich das wildtyp Peptid bei ungefähr 40 Minuten und die Mutante im Bereich von 46,6 Minuten befinden.

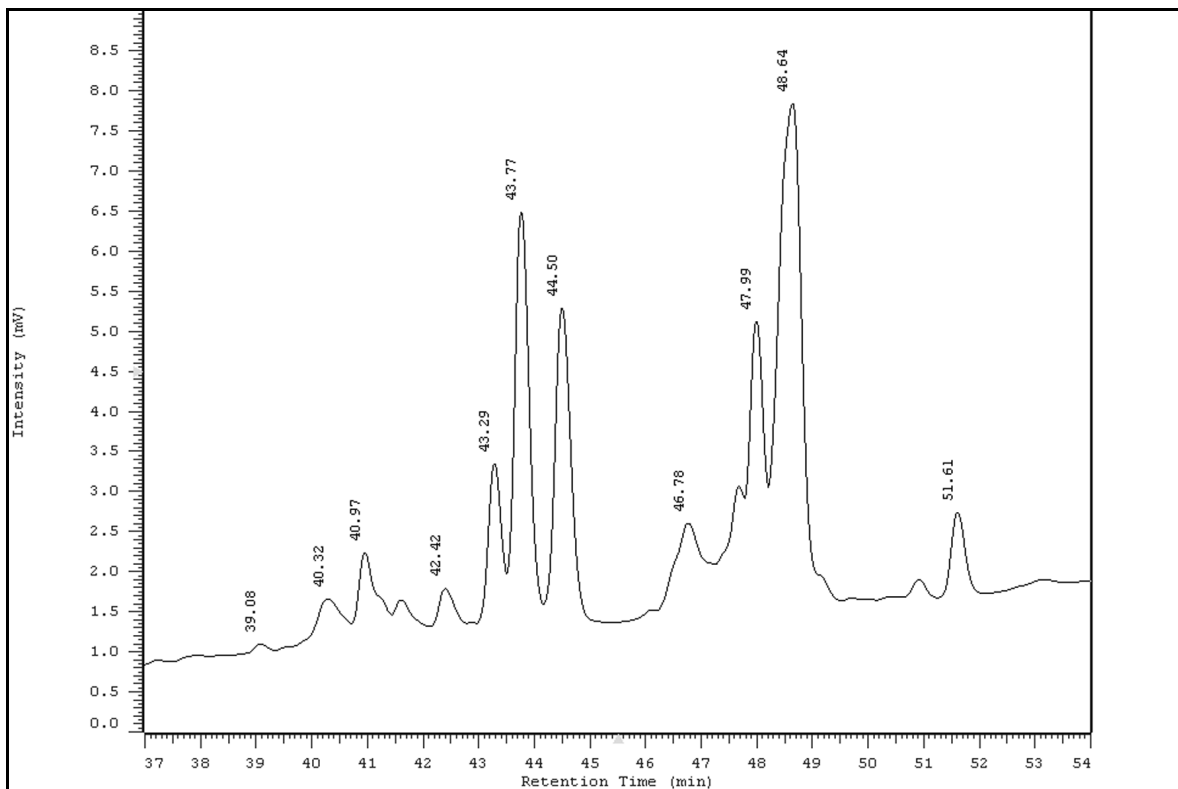


Abbildung 5.15 Zweite HPLC-Auftrennung der zusammengeführten Fraktionen mit Wildtyp und Mutante.

Anhand der Retentionszeiten aus Abbildung 5.13, sollte das wildtyp Peptid bei 40,0 Minuten eluieren, das mutierte Peptid bei ungefähr 46,6 Minuten.

Durch den Zusatz der synthetischen Peptide (Abbildung 5.16) erhöhten sich die Peaks bei 40,17 Minuten und 46,66 Minuten. Der Vergleich mit Abbildung 5.15 zeigt, dass der Peak bei 40,32 Minuten durch Zusatz des synthetischen wildtyp Peptids größer wurde. Der Zusatz synthetischer Mutante führte zu einer Erhöhung der linksseitigen Schulter des Peaks bei 46,78 Minuten. Das wildtyp und mutierte Peptid mit der Arg 719 → Trp Mutation konnten so identifiziert werden.

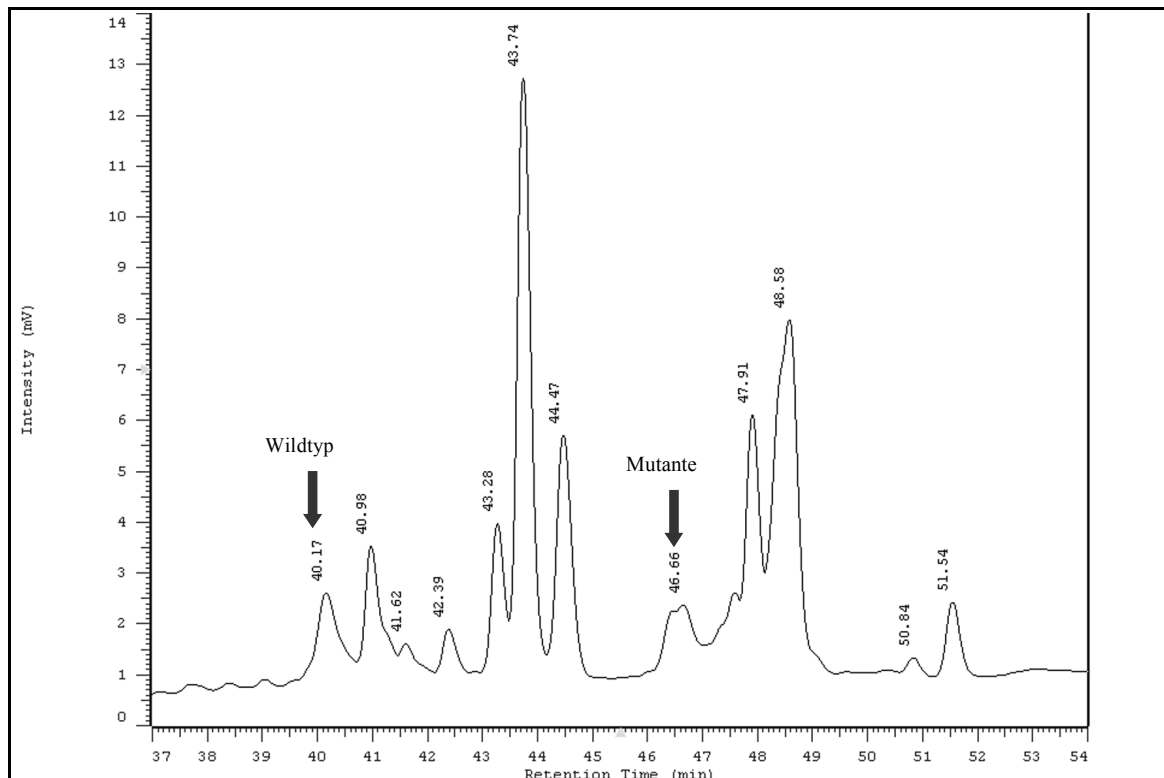


Abbildung 5.16 Koelution der zusammengeführten Fraktionen mit synthetischem Wildtyp und synthetischer Mutante.

HPLC-Spektrum der in Abbildung 5.15 gezeigten Fraktionen mit Zusatz von synthetischen Peptiden, zur eindeutigen Peak-Identifizierung. Wie angezeigt wurde der Peak bei 40,17 Minuten durch den Zusatz synthetischen Wildtyps, der Peak bei 46,66 Minuten durch Zusatz synthetischer Mutante erhöht.

Eine Auswertung der Flächen der Peaks aus Abbildung 5.15 zur Bestimmung des Verhältnisses von Wildtyp zu Mutante war direkt aus den Spektren nicht möglich, da keine eindeutige Einzelparktrennung erreicht wurde. Der Wildtyp-Peak zeigte nach Zusatz von synthetischem Peptid eine Art Schulter (40,17 Minuten in Abbildung 5.16), so dass nur ein Teil des Peaks durch den Wildtyp gebildet wurde (40,32 Minuten in Abbildung 5.15). Die Mutante befindet sich in der linken Schulter des Peaks bei 46,78 Minuten (Abbildung 5.15).

Um eine Auswertung zu ermöglichen, wurde ein Gaußfit des Spektrums vorgenommen. Peaks in HPLC-Spektren können durch Gauß-Kurven beschrieben werden, die bei Benutzung eines Laufmittel-Gradienten eine ähnliche Halbwertsbreite besitzen. Aus diesem Grund wurden das Spektrum aus Abbildung 5.15 durch Gauß-Funktionen mit gleicher Halbwertsbreite angefitet. Der Einfachheit halber geschah dies in zwei Teilen. In Abbildung 5.17 ist der erste Teil des Spektrums mit dem Fit für den Wildtyp-Peak zu

sehen, in Abbildung 5.18 der zweite Teil des Spektrums mit dem Fit für den Peak mit dem mutierten Peptid.

Die dargestellten Fits sind das Ergebnis verschiedener Optimierungsschritte, bei denen die Peakanzahl variiert wurde. Durch die Gradientenelution sollten alle Peaks vergleichbare Halbwertsbreiten besitzen. Daher wurden von mehreren Einzelpeaks die Halbwertsbreiten ermittelt und deren Mittelwert für die Fit-Prozedur verwendet. Die rote Summenkurve des Fits stimmte danach sehr gut mit der schwarzen Summenkurve überein, besonders im Bereich der untersuchten Peaks.

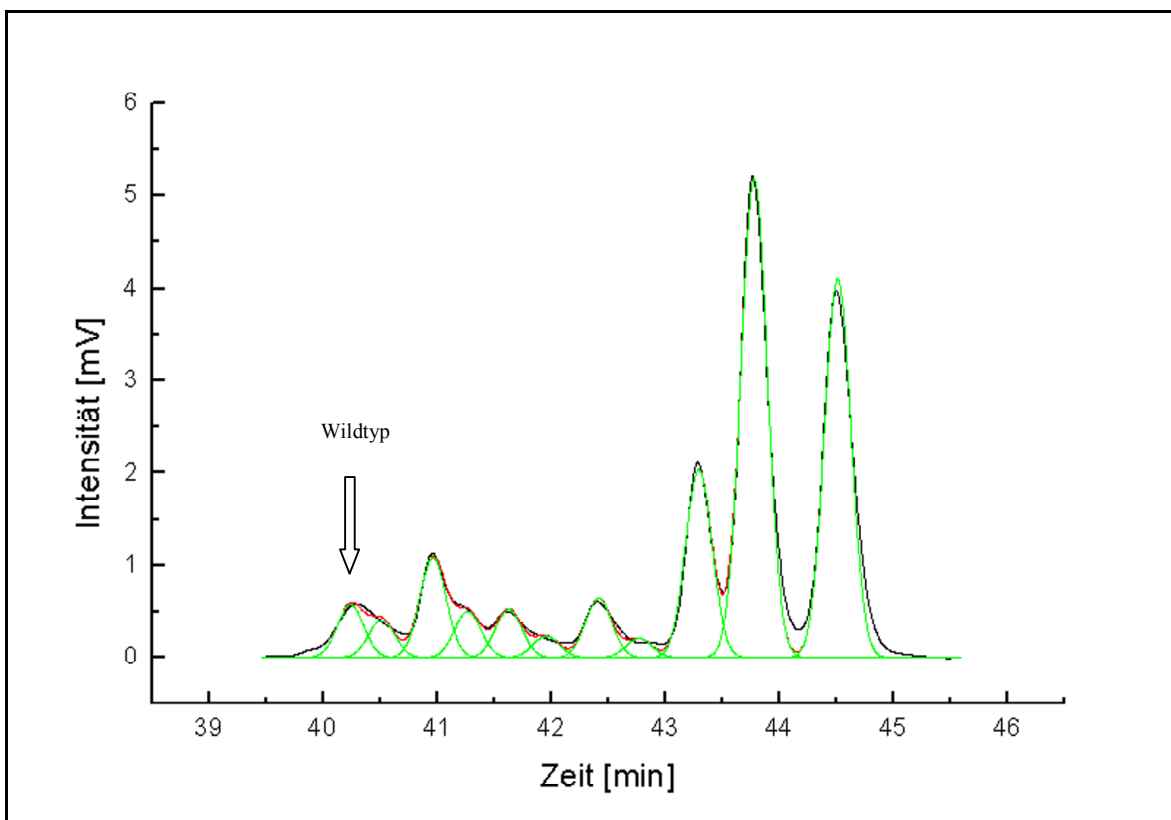


Abbildung 5.17 Gauß-Fit des ersten Spektrum-Teils aus Abbildung 5.15 mit wildtyp Peptid.

Der erste Teil (bis zur 46. Minute) des HPLC-Spektrums aus Abbildung 5.15. Da der Wildtyp-Peak nicht ausreichend freigestellt wurde, wurde er mit einer Gauß-Funktion angefüttet, um die Fläche zu erhalten. Die rote Kurve des Fits stimmte hierbei sehr gut mit der schwarzen Summenkurve überein.

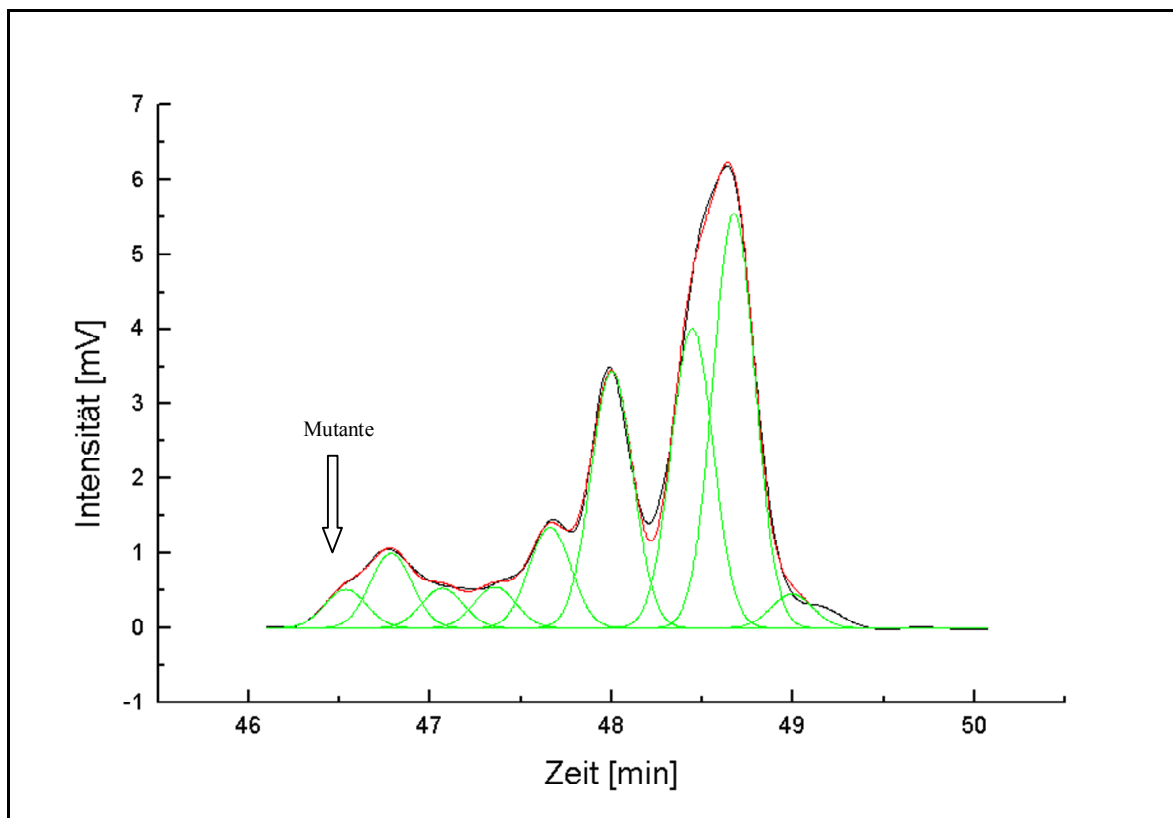


Abbildung 5.18 Gauß-Fit des zweiten Spektrum-Teils aus Abbildung 5.15 mit mutiertem Peptid.

Der zweite Teil (bis zur 50. Minute) des HPLC-Spektrums aus Abbildung 5.15. Da der Peak des mutierten Peptids nicht ausreichend freigestellt wurde, wurde er mit einer Gauß-Funktion angefitet, um die Fläche zu erhalten. Die rote Kurve des Fits stimmte hierbei sehr gut mit der schwarzen Summenkurve überein.

Die auf diese Weise ermittelten Flächen der Peaks von Wildtyp und Mutante wurden zueinander ins Verhältnis gesetzt. Hierbei musste der Wert für die Fläche des Wildtyp-Peaks wegen des abweichenden Extinktionskoeffizienten mit dem Faktor 1,8 korrigiert werden (siehe Abschnitt 0).

Weitere drei Faserbündel wurden auf ähnliche Weise, jedoch nie genau identisch untersucht. Die HPLC-Fraktionierung des Verdauens und die Identifizierung der gesuchten Fraktionen über die Retentionszeit der synthetischen Peptide wurden hingegen für alle Proben gleich durchgeführt. Danach wurde versucht, die Fraktionen für wildtyp und mutierte Peptide einzeln mit verschiedenen Laufmitteln aufzutrennen, um eine Freistellung der zu untersuchenden Peaks zu erreichen. Da durch dieses Verfahren für die Auswertung der Vergleich zweier HPLC-Läufe notwendig wurde, musste ein interner Standard zur Normierung verwendet werden. Allerdings konnte auch durch die Veränderungen der

Chromatographiebedingungen in der zweiten Dimension keine Einzelpeaktrennung erreicht werden. Insgesamt ergab sich keine wesentliche Verbesserung zu dem in den Abbildung 5.14 bis Abbildung 5.18 dargestellten Verfahren.

Bei nicht aufgelösten Peaks wird üblicherweise die Peakhöhe anstelle der Fläche zur Quantifizierung benutzt, wofür allerdings die Zusammensetzung des Eluenten konstant sein muss (Gottwald, 1993). Dies war mit der hier verwendeten Gradientenelution, die zur Auflösung ähnlicher Peptide notwendig ist, nicht vereinbar.

Der Mittelwert aus vier Faserbündeln einer Biopsie des Patienten mit der Arg 719 → Trp Mutation ergab einen Anteil von 40,6 % (+/- 24 % sd) mutierter an der Gesamt-β-MHC.

5.1.5 Kontrollversuch

Um sicherzustellen, dass während der verschiedenen Chromatographieschritte nicht ein Peptid stärker adsorbierte als das andere, wurde mit den synthetischen Peptiden der Gly 584 → Arg und Arg 719 → Trp Mutation ein Kontrollversuch durchgeführt. Für jede Mutation wurden die zur Quantifizierung benutzten Methoden verwendet (analog zu den Abschnitten 5.1.3 und 5.1.4).

Das verdaute Myosin wurde in zwei Portionen geteilt. Der einen Portion wurde eine 1:1 Mischung von synthetischen wildtyp und mutierten Peptiden etwa in der Konzentration der natürlichen Peptide zugesetzt. Beide Ansätze wurden mit den gleichen zwei Chromatographieschritten aufgetrennt. Für die Ermittlung der Peakflächen wurde auf ein in beiden Verdauteilen vorkommendes internes Standardpeptid normiert. Die Fläche des Wildtyp-Peaks aus dem Verdauteil ohne Zusatz synthetischer Peptide wurde von der Fläche des Wildtyp-Peaks aus dem Verdauteil mit Zusatz synthetischer Peptide abgezogen, um nur die Fläche des zugesetzten synthetischen Wildtyps zu erhalten.

Zur Fehlerabschätzung wurde die Abweichung vom eingesetzten 1:1 Verhältnis von Wildtyp zu Mutante bestimmt. Im Kontrollversuch für die Peptide mit der Gly 584 → Arg Mutation wurde das Verhältnis 0,83, für die Peptide mit der Arg 719 → Trp Mutation das Verhältnis 1,16 gemessen. Für beide Mutationen konnte das eingesetzte Mengenverhältnis von wildtyp und mutiertem Peptid, mit einer relativen Abweichung von 17 bzw. 16 Prozent, reproduziert werden. Es wurde also sichergestellt, dass sich beide Peptide innerhalb dieses Fehlers während der Versuchsdurchführungen gleich verhielten und nicht eines stärker an Kontaktflächen adsorbierte als das andere.

5.2 Quantifizierung auf mRNA-Ebene

Auf Proteinebene konnte gezeigt werden, dass bei den untersuchten FHC-Patienten eine Abweichung vom erwarteten 1:1 Verhältnis des Wildtyps zur Mutante auftrat. Um festzustellen, woher diese Abweichung stammte, wurde im nächsten Schritt das Verhältnis von Wildtyp zu Mutante auf mRNA-Ebene untersucht. Abbildung 3.3 zeigt die nötigen Analyseschritte.

Es wurden native Muskelbiopsien von Patienten mit der Val 606 → Met (H 5) und Arg 719 → Trp (H 13) untersucht. Für die Bestimmung des Anteils der mutierten an der Gesamtmenge der β -MHC mRNA wurde die Tatsache ausgenutzt, dass durch den Basenaustausch der Mutation die Schnittstelle für eine Restriktionsendonuklease erzeugt oder vernichtet wurde. Bei heterozygoten Patienten wurde also entweder die wildtyp oder mutierte Sequenz geschnitten. Nach RNA-Isolierung, reverser Transkription und PCR des zu untersuchenden Sequenzabschnittes folgte ein Restriktionsverdau. Hierdurch wurden definierte DNA-Stücke erhalten, die elektrophoretisch aufgetrennt und über ihre Länge identifiziert werden konnten. Die Mengen der Fragmente, die charakteristisch für wildtyp und mutierte mRNA waren, konnten anschließend densitometrisch ermittelt und ins Verhältnis gesetzt werden.

Um zu beweisen, dass die Verdauemuster der Patientenproben H 13 und H 5 spezifisch waren, wurden die Versuchsprozedur ebenfalls mit Wildtyp-Kontrollproben gesunder Menschen durchgeführt.

Die Banden wurden densitometrisch ausgewertet, wobei ein Molekulargewichtsstandard zum Kalibrieren diente. Jede Bande dieses Standards enthielt äquimolare Mengen unterschiedlich langer DNA Stücke. Es wurden verschiedene Mengen des Standards mit jedem zu untersuchenden Restriktionsverdau elektrophoretisch aufgetrennt (Abbildung 5.25). Aus den bekannten Mengen und der von einem Photosystem gemessenen zugehörigen Intensität der Banden konnte für jedes Gel eine Kalibriergerade erstellt werden (Abbildung 5.26). Hierbei wurde sichergestellt, dass die Intensitäten der vermessenen Proben im gleichen Bereich lagen wie die des Standards. Mit dieser Kalibriergeraden wurden die Mengen der einzelnen Verdaufragmente bestimmt. Abschließend wurden die Mengen der für den Wildtyp charakteristischen Fragmente mit denen für die Mutante charakteristischen Fragmente ins Verhältnis gesetzt.

5.2.1 Bestimmung des Anteils der mutierten an der Gesamt- β -MHC mRNA in Muskelbiopsien des Patienten H 13 mit Arg 719 \rightarrow Trp Mutation

Aus den nativen Muskelbiopsien wurde Total-RNA isoliert und mit einem genspezifischen Primer in cDNA umgeschrieben (Abbildung 4.6). Für die anschließende PCR wurden spezielle Primer wie in Abschnitt 4.3.5 beschrieben konstruiert. Abbildung 5.19 stellt die Positionen der Primer auf cDNA schematisch dar.

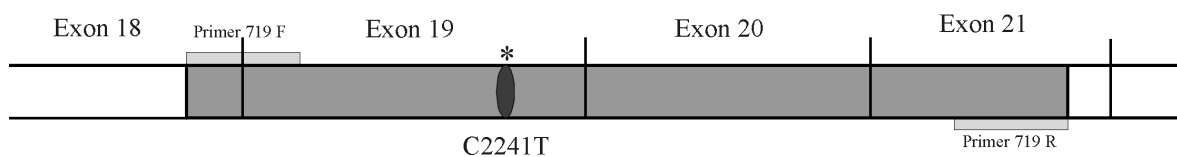


Abbildung 5.19 PCR-Produkt der β -MHC cDNA des Patienten H 13 (Arg 719 \rightarrow Trp).

Die Exons sind durch schwarze Kästen symbolisiert. Der dunkelgraue Bereich stellt das PCR-Produkt dar, welches von den Primern (hellgraue Kästen) flankiert wird. Die mit dem Stern markierte Ellipse zeigt die Stelle der Mutation.

Das PCR-Produkt wurde mit der Restriktionsendonuklease Msp I verdaut. Durch den Basenaustausch C2241T ging eine Schnittstelle dieses Enzyms in der mutierten Sequenz verloren. Die PCR-Produkte mit den verschiedenen Restriktionsschnittstellen für Wildtyp und Mutante sind im oberen Teil der Abbildung 5.20 schematisch dargestellt. Das wildtyp Produkt besitzt zwei Msp I Schnittstellen und das Produkt des mutierten Allels eine Schnittstelle.

In dem schematischen Gel im unteren Teil von Abbildung 5.20 wird das durch Msp I Verdau entstehende Fraktionsmuster verdeutlicht. In Spur 1 ist das unverdaute PCR-Produkt von 378 bp symbolisiert. Bei einer Wildtyp-Probe würde sich nach einem Msp I Verdau ein Muster wie in Spur 2 ergeben. Drei Verdaufragmente mit 146 bp, 123 bp und 109 bp sind sichtbar. Bei einer hypothetischen homozygoten Probe mit der C2241T Mutation ergäbe sich ein Muster wie in Spur 3. Durch den Wegfall einer Schnittstelle für Msp I entstehen Fragmente von 269 bp und 109 bp. Der Fall einer heterozygoten Probe, dargestellt in Spur 4, ergibt sich somit als Addition der Muster aus den Spuren 2 und 3.

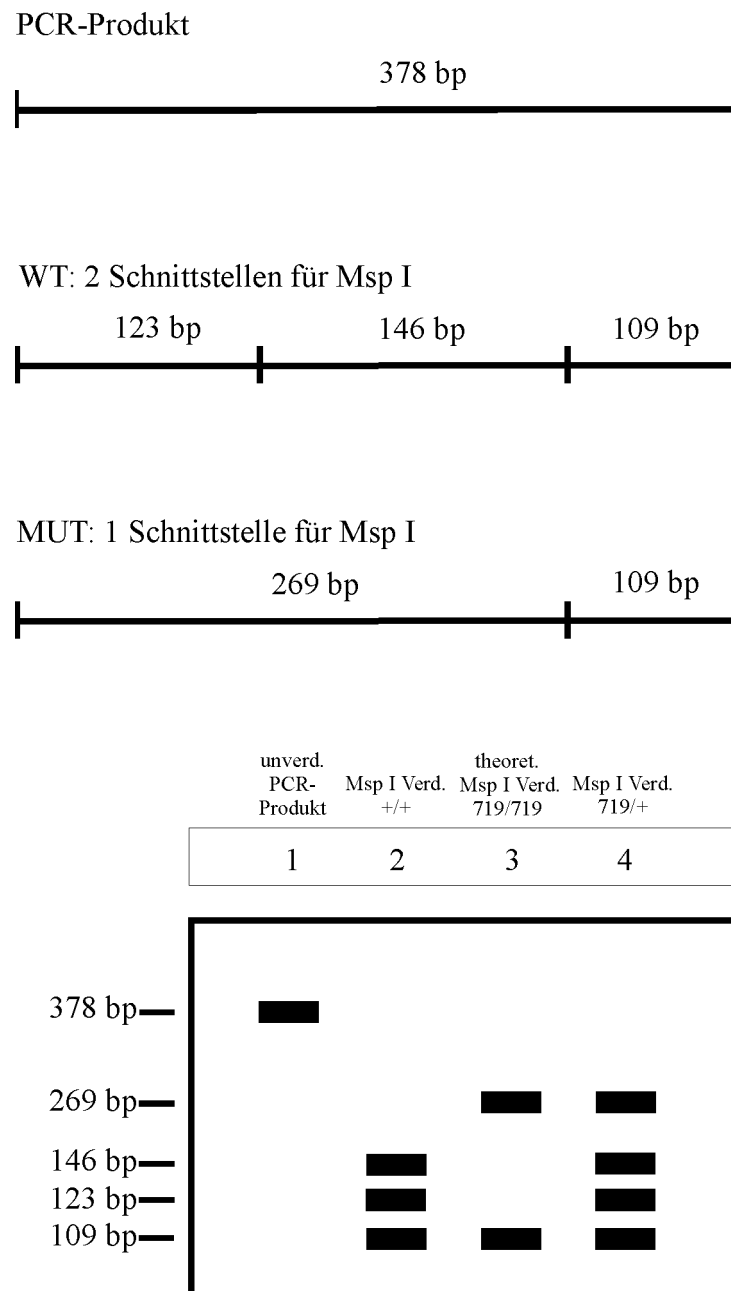


Abbildung 5.20 PCR-Produkte, Msp I Schnittstellen und Verdaufragmentmuster für die Patientenprobe H 13 (Arg 719 → Trp).

Oben: Länge der PCR Fragmente für Wildtyp und Mutante und zugehörige Schnittstellen für Msp I. Unten: Muster der Verdaufragmente nach elektrophoretischer Auftrennung. Spur 1: unverdautes PCR-Produkt von 378 bp. Spur 2: Msp I-Verdau einer Wildtyp-Probe mit drei Verdaufragmenten, 146 bp, 123 bp und 109 bp. Spur 3: Hypothetische homozygote Probe mit der C2241T Mutation. Durch den Wegfall einer Schnittstelle für Msp I entstehen Fragmente von 269 bp und 109 bp. Spur 4: Heterozygote Probe. Das Muster entsteht durch Addition der Muster aus Spur 2 und 3.

Abbildung 5.21 zeigt ein reales Gel der PCR und Restriktionsverdau von Wildtyp und mutierter H 13 Probe (Arg 719 → Trp). In Spur 1 ist der äquimolare Molekulargewichtsstandard aufgetragen und in Spur 3 das 378 bp lange PCR-Produkt. Der Leerwert in Spur 2 ist ein PCR-Ansatz ohne cDNA, um zu zeigen, dass das entstehende Produkt in Spur 3 spezifisch erhalten wurde und nicht durch mögliche DNA-Verunreinigungen. In Spur 4 ist ein Restriktionsverdau mit Msp I einer Wildtyp-Kontrollprobe zu sehen, bei dem die nach Abbildung 5.20, Spur 2 erwarteten drei Fragmente sichtbar sind. Die untersuchte Probe H 13 (Arg 719 → Trp) in Spur 5 stammt von einem heterozygoten Mutationsträger. Es entstehen vier Verdaufragmente, von denen das Stück mit 269 bp charakteristisch für das mutierte Allel und die Stücke mit 146 bp und 123 bp charakteristisch für das wildtyp Allel sind. Da das Fragment mit 109 bp beim Verdau von Wildtyp und Mutante entsteht, konnte es als Kontrolle für die Gesamtmenge der Fragmente dienen.

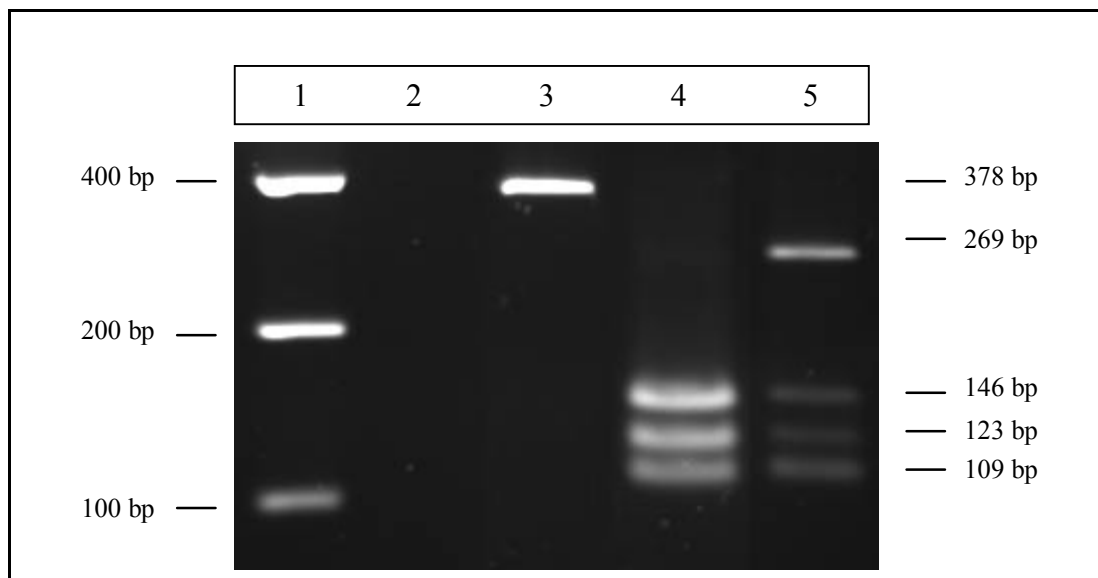


Abbildung 5.21 Agarosegel der PCR-Produkte und des Msp I Verdau der cDNA des Patienten H 13 (Arg 719 → Trp).

Agarosegel (2,5 %). Spur 1: Äquimolarer Molekulargewichtsstandard, Spur 2: Leerwert der PCR, Spur 3: PCR-Produkt von 378 bp, Spur 4: Msp I-Verdau einer Wildtyp-Kontrolle, Spur 5: Msp I-Verdau einer H 13 Probe (Arg 719 → Trp).

Die Vollständigkeit des Restriktionsverdau der Probe H 13 (Arg 719 → Trp) konnte durch Abwesenheit der 378 bp Bande des unverdauten PCR-Produktes sichergestellt werden.

Sowohl die für den Wildtyp charakteristischen, als auch die für die Mutante charakteristischen Banden im Gel wurden durch den MspI Verdau erzeugt. Eine fehlerhafte Mengenbestimmung konnte ausgeschlossen werden, weil es sehr unwahrscheinlich war, dass nur die erste Schnittstelle im wildtyp PCR-Produkt (siehe Abbildung 5.20) nicht gespalten würde. In diesem Fall entstünde ein, von der Mutante nicht zu unterscheidendes, Fragment von 269 bp.

Für die abschließende Mengenbestimmung wurden die mit der Kalibrierkurve ermittelten DNA-Mengen des mutierten Fragments (269 bp) zum Mittelwert der Mengen der wildtyp Fragmente (146 bp und 123 bp) ins Verhältnis gesetzt.

Aus vier nativen Biopsiestücken wurde unabhängig Total-RNA extrahiert, die zu cDNA transkribiert wurde. Mit jeder cDNA wurden vier PCRs durchgeführt, aus denen ein oder zwei Verdaureaktionen erfolgen konnten. Damit ergaben sich für jede der vier cDNA Ansätze neun Verdauergebnisse, aus denen ein Mittelwert gebildet wurde. Der Mittelwert der Ergebnisse von vier Biopsieproben mit der Arg719 → Trp Mutation ergab somit einen Anteil von 57 % (+/- 0,9 % sd) mutierter β -MHC mRNA.

5.2.2 Bestimmung des Anteils der mutierten an der Gesamt- β -MHC mRNA in Muskelbiopsien des Patienten H 5 mit der Val 606 → Met Mutation

Da für den Patienten H 5 (Val 606 → Met) ein Anteil von 12 Prozent mutiertem Myosin gefunden wurde (Nier et al., 1999), war es hier besonders interessant zu untersuchen, auf welchem Schritt der Genexpression es zur Abweichung vom 1:1 Verhältnis der DNA-Ebene kommt. Für die Bestimmung des Anteils der mutierten an der Gesamt- β -MHC mRNA konnte Histologiematerial des Patienten H 5 mit Val 606 → Met Mutation verwendet werden.

Um sicherzustellen, dass die Total-RNA nach sechsjähriger Lagerung der Histologieproben bei -80°C noch intakt war, wurde sie auf einem denaturierenden RNA-Gel überprüft (Abbildung 5.22) (Lehrach et al., 1977). Die Bandenschärfe und das 2:1 Absorptionsverhältnis der 28S rRNA zur 18S rRNA ließ erkennen, dass die isolierte RNA höchstens wenig degradiert war. Außerdem war kaum niedermolekularer Schmier erkennbar, der auf Degradation hindeuten würde (Sambrook and Russell, 2001).

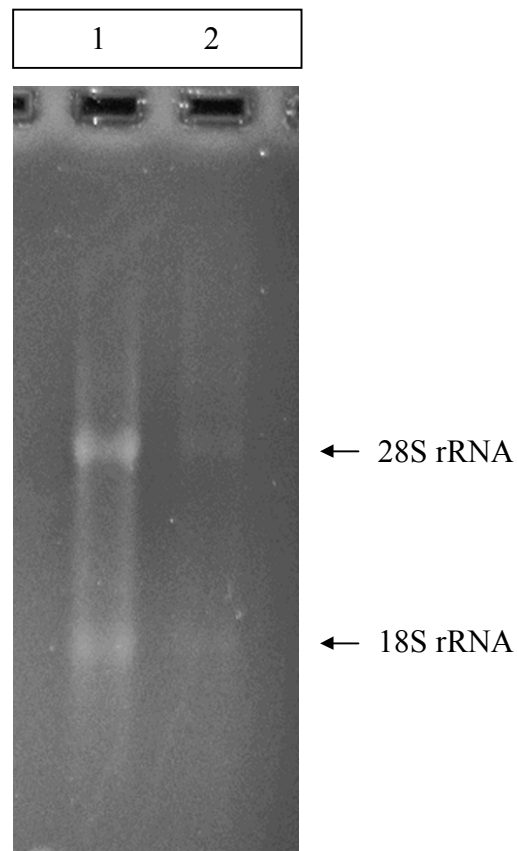


Abbildung 5.22 Denaturierendes Agarosegel zur Überprüfung der Total-RNA.

Denaturierendes Agarosegel (1 %). Total-RNA isoliert aus Histologieproben. Spur 1: Kontrollprobe, Spur 2: Patientenprobe H 5 (Val 606 → Met). Die Schärfe der 28S-rRNA- und 18S-rRNA-Banden und deren Absorptionsverhältnis zeigen, dass die isolierte RNA höchstens wenig degradiert war. Es ist kaum niedermolekularer Schmier erkennbar, der auf Degradation hindeuten würde (Sambrook and Russell, 2001)

Zuerst wurde die Total-RNA mit dem genspezifischen Primer in cDNA umgeschrieben. Die cDNA wurde mit hochspezifischen Primern in der darauffolgenden PCR vervielfältigt. In Abbildung 5.23 ist die Lage der Primer in der β -MHC cDNA-Sequenz dargestellt. Die Primer wurden wie in Abschnitt 4.3.5 beschrieben konstruiert. Im Gegensatz zu den Versuchen aus Abschnitt 5.2.1 besitzt das wildtyp PCR-Produkt keine natürlichen Schnittstellen für das hier verwendete Restriktionsenzym. Um beim abschließenden Verdau wildtyp und unverdaute PCR-Fragmente unterscheiden zu können, wurde mit dem

forward Primer eine Schnittstelle für die Restriktionsendonuklease eingeführt. Durch den Verdau mit Nla III wurde dann ein 20 bp Fragment abgespalten.

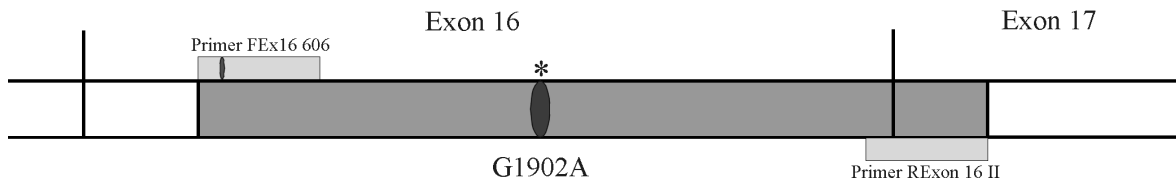


Abbildung 5.23 PCR-Produkt der β -MHC cDNA des Patienten H 5 (Val 606 \rightarrow Met).

Die Exons sind durch schwarze Kästen symbolisiert. Der dunkelgrau markierte Bereich stellt das PCR-Produkt dar, welches von den Primern (hellgraue Kästen) flankiert wird. Die mit dem Stern markierte Ellipse zeigt die Stelle der Mutation. Die kleinere Ellipse in dem hellgrauen Kasten symbolisiert die Basenfehlpaarung im mutagenen forward Primer. Damit wurde eine zusätzliche Restriktionsschnittstelle zur Verdaukontrolle eingeführt.

Durch die Basensubstitution G1902A bei der hier untersuchten Val 606 \rightarrow Met (Patient H 5) Mutation wurde im mutierten Allel eine Nla III Schnittstelle erzeugt. Zusammen mit der durch den Primer eingeführten Schnittstelle, besitzt das mutierte Produkt zwei Spaltpunkte für Nla III, das wildtyp Produkt eine.

In Abbildung 5.24 sind die PCR-Produkte und Schnittstellen für Nla III zusammen mit dem Muster der Verdaufragmente nach elektrophoretischer Auftrennung schematisch dargestellt. Spur 1 zeigt das unverdaute PCR-Produkt, Spur 2 den Nla III Verdau einer Wildtyp-Probe. Das wildtyp Fragment entsteht durch Abspaltung eines 20 bp Stückes, welches vom mutagenen forward Primer erzeugt wurde. In Spur 3 ist der Verdau einer hypothetischen homozygoten Patientenprobe darstellt. Die Addition der Muster aus den Spuren 2 und 3 ergibt das Bild für eine heterozygote Patientenprobe wie H 5 (Val 606 \rightarrow Met) in Spur 4. Das Fragment mit 267 bp ist charakteristisch für das wildtyp Allel. Die Fragmente mit 180 bp und 87 bp sind charakteristisch für das mutierte Allel. Die 20 bp Spaltstücke sind hellgrau dargestellt, da sie in einem realen dreiprozentigen Gel aus der Matrix laufen und somit nicht nachweisbar sind.

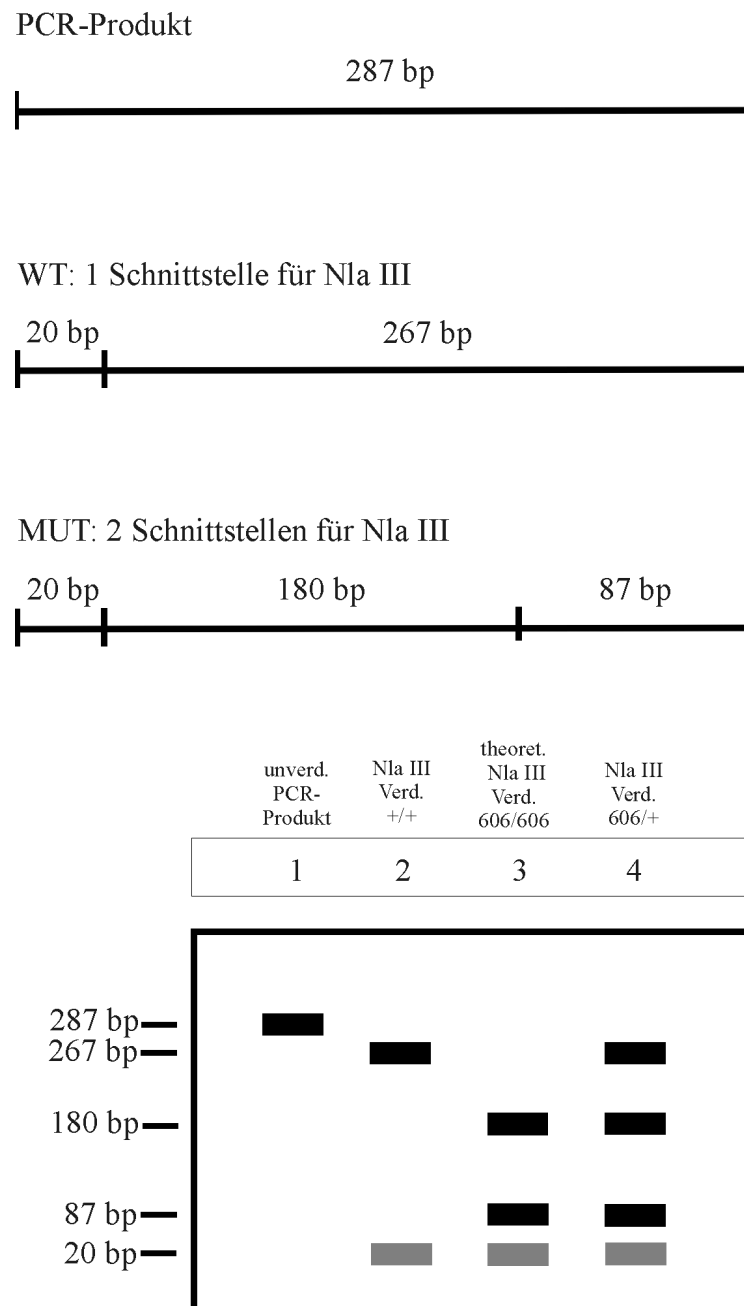


Abbildung 5.24 PCR-Produkte, Nla III Schnittstellen und Verdaufragmentmuster für die Patientenprobe H 5 (Val 606 → Met).

Oben: PCR-Produkte und Schnittstellen für Nla III. Unten: Muster der Verdaufragmente nach elektrophoretischer Auftrennung. Spur 1: unverdautes PCR-Produkt. Spur 2: Nla III Verdau einer Wildtyp-Probe. Das wildtyp Fragment entsteht durch Abspaltung eines 20 bp Stückes, welches vom mutagenen forward Primer erzeugt wurde. Spur 3: Hypothetische homozygote Patientenprobe. Spur 4: Heterozygote Patientenprobe wie H 5. Das Muster entsteht durch Addition der Muster aus Spur 2 und 3. Die 20 bp Spaltstücke sind hellgrau dargestellt, da sie im realen dreiprozentigen Gel nicht nachweisbar sind.

Abbildung 5.25 zeigt das reale Gel mit Kontrollprobe und Patientenprobe H 5 (Val 606 → Met). Spur 6 zeigt das PCR-Produkt von 287 bp und den zugehörigen Leerwert in Spur 5. Damit wurde sichergestellt, dass keine DNA-Verunreinigungen in den PCR-Ansätzen vorhanden waren. Der Nla III Verdau einer Wildtyp-Kontrollprobe wurde in Spur 7 aufgetragen. Wie erwartet ist das Fragment 20 bp kürzer als das PCR-Produkt. In Spur 8 ist das Muster eines Nla III Verdau einer heterozygoten Patientenprobe mit der Val 606 → Met Mutation zu sehen. Es ergeben sich drei Verdaufragmente, von denen das 267 bp Stück das wildtyp Allel repräsentiert und die 180 bp und 87 bp Stücke das mutierte Allel.

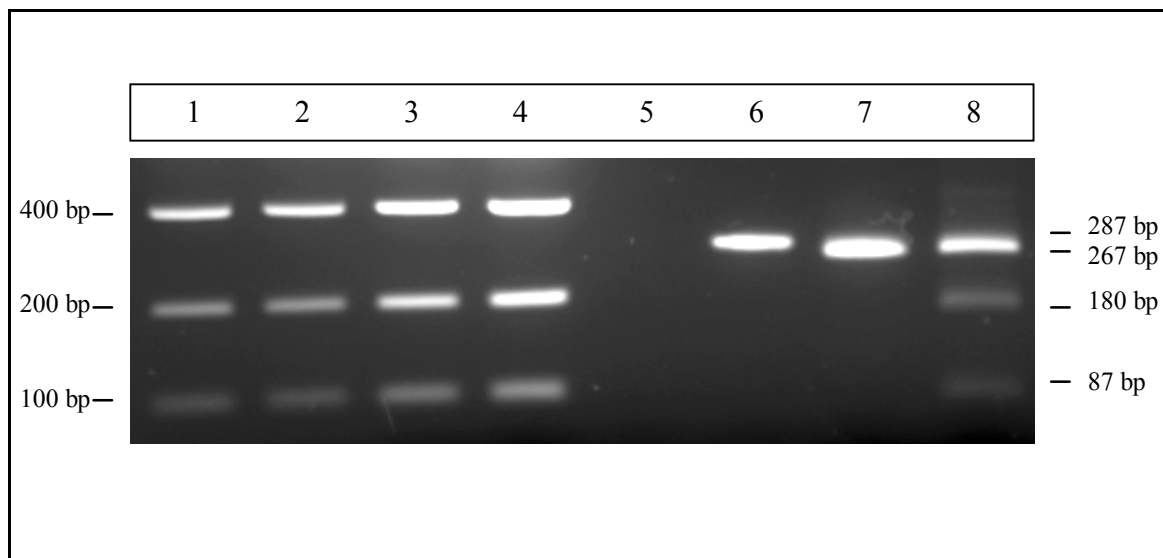


Abbildung 5.25 Agarosegel der PCR-Produkte und des Nla III Verdau der cDNA des Patienten H 5 (Val 606 → Met).

Agarosegel (3 %). Spur 1 bis Spur 4: 2 µl, 2 µl, 4 µl und 6 µl des äquimolaren Molekulargewichtstandards, Spur 5: Leerwert, Spur 6: PCR-Fragment von 287 bp, Spur 7: Nla III Verdau einer Wildtyp-Kontrollprobe, Spur 8: Nla III Verdau des PCR-Produktes der Patientenprobe H 5 (Val 606 → Met).

Der äquimolare Standard wurde 1:2 verdünnt und in unterschiedlichen Mengen aufgetragen (Spuren 1 bis 4 in Abbildung 5.25). Zwei Microliter des unverdünnten Standards enthalten 20 ng des 400 bp Fragments, 10 ng des 200 bp Fragments und 5 ng des 100 bp Fragments. Hieraus konnte, wie bereits zu Anfang des Kapitels beschrieben, eine Kalibriergerade für die Proben desselben Gels erstellt werden (Abbildung 5.26).

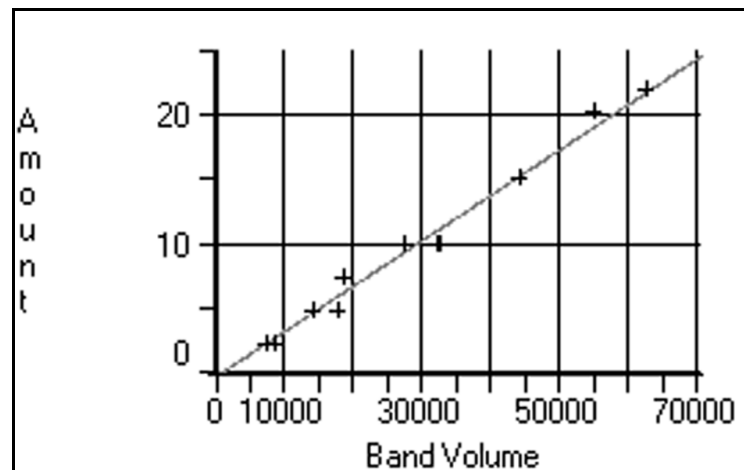


Abbildung 5.26 Kalibriergerade aus äquimolarem Molekulargewichtsstandard.

Beispiel für eine Kalibriergerade aus den bekannten Mengen (Amount) und Intensitäten (Band volume) des äquimolaren Molekulargewichtsstandards. Diese Gerade wurde aus den Werten der Banden von Spur 1 bis 4 aus Abbildung 5.25 ermittelt. Die Gerade gibt den linearen Zusammenhang zwischen Menge und Intensität der Banden im Bereich der Messungen wieder.

Für die Auswertung wurden die mit der Kalibrierkurve ermittelten DNA-Mengen des wildtyp Fragments (267 bp) zum Mittelwert der Mengen der mutierten Fragmente (180 bp und 87 bp) ins Verhältnis gesetzt.

Aus zwei nativen Biopsiestücken wurde je einmal unabhängig Total-RNA extrahiert. Aus dem einen Total-RNA-Ansatz konnte dreimal cDNA, aus dem anderen zweimal cDNA transkribiert werden. Mit jedem cDNA-Ansatz wurden vier PCR-Reaktionen durchgeführt, aus denen jeweils zwei Restriktionsverdauungen (insgesamt 40 Stück) erfolgten. Aus den Ergebnissen der Restriktionsverdauungen, die mit dem gleichen cDNA-Ansatz durchgeführt wurden, wurde der Mittelwert gebildet. Schließlich ergab sich aus zwei Biopsieproben mit der Val 606 → Met Mutation ein mittlerer Anteil von 28 % (+/- 2,7 % sd) mutierter β -MHC mRNA.

5.2.3 Fehlerbetrachtung

In beiden Versuchen waren neben dem erwarteten PCR-Produkt keine weiteren Banden sichtbar. Dies bedeutet, dass nur intakte RNA bzw. cDNA ohne Verunreinigung genomischer DNA amplifiziert wurde. Des Weiteren wurde damit gezeigt, dass die konstruierten Primer hochspezifisch an die cDNA hybridisierten. In den Spuren mit den

Restriktionsverdauen sind ebenfalls keine, außer den erwarteten Banden sichtbar. Dies zeigt, dass der Restriktionsverdau innerhalb der Nachweisgrenze optimal stattgefunden hat.

In den Gelen der Proben des Patienten H 13 (Arg 719 → Trp) kann die Summe der Verdaufragmente von 109 bp als interne Kontrolle benutzt werden (Abschnitt 5.2.1). Bei einem Restriktionsverdau entstehen die Fragmente des wildtyp Allels in äquimolaren Mengen und die Fragmente des mutierten Allels in äquimolaren Mengen. Bei der hier vorliegenden heterozygoten Patientenprobe entsteht beim Verdau von mutiertem und wildtyp Allel ein gleich großes Fragment. Die Summe der Menge des für die Mutante charakteristischen Fragments und des Mittelwerts der Menge der für den Wildtyp charakteristischen Fragmente muss also gleich der Menge des bei beiden entstehenden Fragments sein (Abbildung 5.20). Die Auswertung dieser internen Kontrolle ergab, dass die Summe der Menge der für Wildtyp und Mutante charakteristischen Fragmente 7 Prozent über der Summe der Kontrollmenge lag.

Eine weitere Kontrolle zur Fehlerabschätzung der Versuche zur Probe H 13 (Arg 719 → Trp) stellten die Verdaue der Kontrollproben mit Msp I dar. Da bei einem Restriktionsverdau einer (homozygoten) Wildtyp-Kontrolle äquimolare Mengen an Verdaufragmenten entstehen müssen, sollte das Verhältnis der hier entstehenden drei Stücke 1:1:1 sein. Die Abweichung vom erwarteten Mittelwert 33,3 % betrug +/- 7,7 %, da Werte im Bereich von 25,6 bis 41% gefunden wurden. Die relative Abweichung beträgt damit +/- 23 %. Diese Abweichung kam zustande, obwohl im Gel keine unverdauten Banden sichtbar waren. Somit gibt dieser Versuch wahrscheinlich den besten Hinweis auf den bei dieser Methode anzunehmenden Fehler.

Analoge Kontrollen ließen sich für den Verdau der Patientenprobe H 5 (Val 606 → Met) nicht durchführen, da die dazu nötige 20 bp-Bande zu klein war und aus dem Gel lief. Aber weil im Prinzip die gleiche Methode angewandt wurde, kann für die Ergebnisse beider Proben ein relativer Fehler von 23 % angenommen werden. Für die Anteile der mutierten β -MHC mRNA des Patienten H 13 (Arg 719 → Trp) ergeben sich dann Werte von 44 bis 70 %, im Mittel also 57 % +/-13 %. Für den Patienten H 5 (Val 606 → Met) ergeben sich Anteile mutierter β -MHC mRNA von 21,6 bis 34,4 %, im Mittel 28 % +/- 6,4 %.

In Abbildung 5.27 sind abschließend die bekannten und in dieser Arbeit ermittelten Werte für mutierte mRNA und mutiertes Myosin der Patienten H 2 (Gly 584 → Arg), H 5 (Val 606 → Met) und H 13 (Arg 719 → Trp) zusammengestellt.

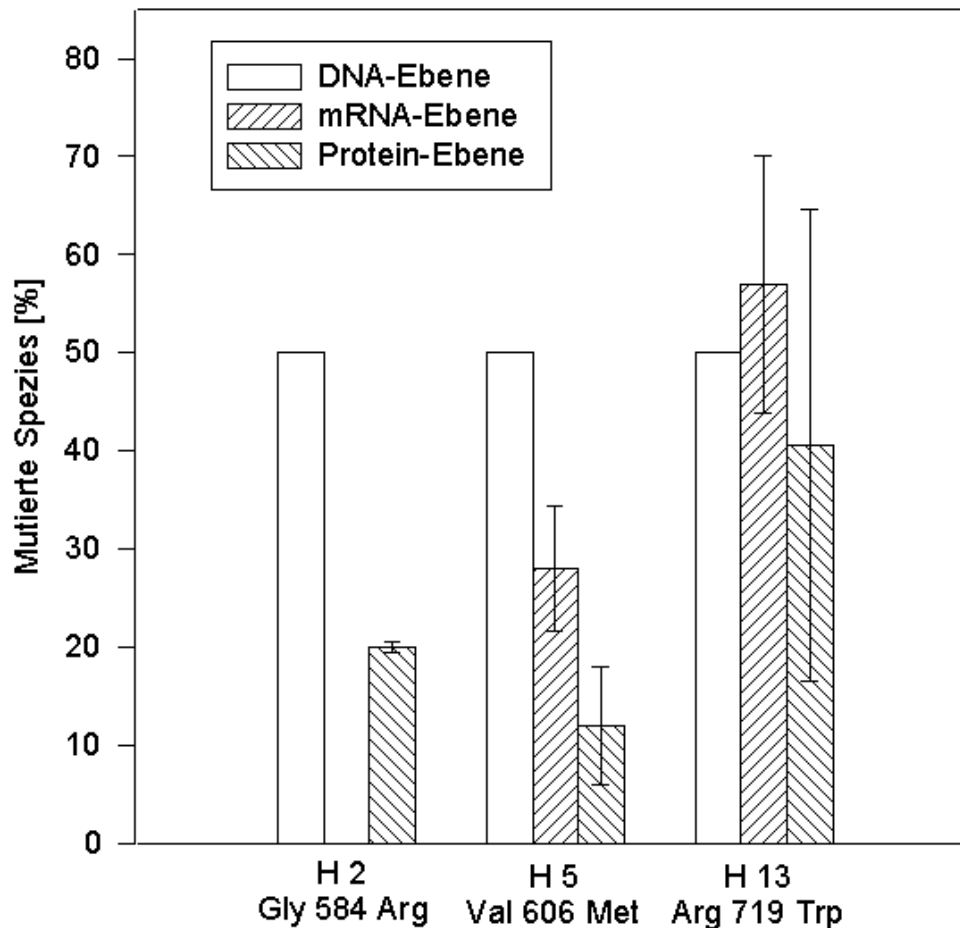


Abbildung 5.27 Gehalt an mutierter DNA, mRNA und mutiertem Myosin der Patienten H 2 (Gly 584 → Arg), H 5 (Val 606 → Met) und H 13 (Arg 719 → Trp).

H 2: 50 % mutierte DNA; 20 % mutiertes Myosin mit einer Standardabweichung von 0,6 % (Fehlerbalken). H 5: 50 % mutierte DNA; 28 % mutierte mRNA (2,7 % Standardabweichung) mit einem relativen Fehler von +/- 23 % (Fehlerbalken); 12 % mutiertes Myosin mit einer Standardabweichung von 6 % (Fehlerbalken) (Proteinwert (Nier et al., 1999)). H 13: 50 % mutierte DNA; 57 % mutierte mRNA (0,9 % Standardabweichung) mit einem relativen Fehler von +/- 23 % (Fehlerbalken); 40 % mutiertes Myosin mit einer Standardabweichung von 24 % (Fehlerbalken). Für die Fehlerbalken wurde jeweils der größere Wert von Standardabweichung oder relativem Fehler ausgewählt.

6 Diskussion

6.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

In Muskelbiopsien von Patienten mit FHC sollte der Anteil mutierter β -MHC an der Gesamt- β -MHC ermittelt werden. Ziel war es, Hinweise auf eine Korrelation zwischen Schweregrad der Krankheit und dem Anteil an mutiertem Myosin zu finden. Da ein Anteil an Mutante gefunden wurde, der nicht den bei heterozygoten Patienten erwarteten 50 Prozent entsprach, sollte im nächsten Schritt untersucht werden, ob diese Abweichung bereits auf mRNA-Ebene auftritt. Damit soll ein Hinweis erhalten werden, ob diese Abweichung bei der Transkription oder Translation entsteht.

Nier et al. hatten in Proben eines klinisch wenig betroffenen Patienten mit der Val 606 \rightarrow Met Mutation einen Anteil von nur 12 Prozent mutierter an der Gesamt- β -MHC gefunden. Mit dieser Methode konnte eine weitere Probe eines klinisch wenig betroffenen Patienten mit der Gly 584 \rightarrow Arg Mutation analysiert werden. Die Quantifizierung der mutierten β -MHC ergab einen Anteil von 20 % (\pm 0,6 % sd) mutiertem Protein. Durch eine Modifikation der Methode konnte bei einem stark betroffenen Patienten mit der Arg 719 \rightarrow Trp Mutation der Gehalt an mutierter β -MHC als 40 % (\pm 24 % sd) ermittelt werden. Die Untersuchung auf mRNA-Ebene ergab für eine Probe mit der Val 606 \rightarrow Met Mutation einen Anteil von 28 % (\pm 2,7 % sd) mutierter an der Gesamtmenge der β -MHC mRNA. Von der Probe mit der Gly 584 \rightarrow Arg Mutation war kein natives Material mehr vorhanden, so dass hier keine mRNA-Analyse erfolgen konnte. Der Anteil an mRNA mit der Arg 719 \rightarrow Trp Mutation an der Gesamtmenge der β -MHC mRNA betrug 57 % (\pm 0,9 % sd) (Abbildung 5.27).

6.2 Diskussion der proteinchemischen Methode

6.2.1 Auswahl der Methode

Für die Identifizierung und Quantifizierung von wildtyp und mutiertem Myosin wurde ein mehrstufiges Verfahren benutzt. Aus der Muskelbiopsie wurde das Myosin extrahiert und mit Lys-C verdaut. Die entstehenden 200 Verdaufragmente wurden in zwei Chromatographieschritten getrennt. Für die Gly 584 \rightarrow Arg Mutation wurde eine Kombination aus HPLC und CE verwendet. Mit dieser Methode konnten die

Verdaufragmente der Probe mit der Arg 719 → Trp Mutation nicht getrennt werden. Daher wurde hier die Trennung über eine Kombination von zwei HPLC-Schritten angewendet. Mit dem zweiten Chromatographieschritt konnten die gesuchten Peptide abschließend identifiziert und quantifiziert werden.

Diese Methode wurde gewählt, um zwei 220 kDa große Proteine (β -MHC), die sich nur in einer Aminosäure unterscheiden, unterscheiden und quantifizieren zu können. Der Aminosäureaustausch ändert die physiko-chemischen Eigenschaften des Gesamtproteins nicht stark genug, um zum Beispiel eine Unterscheidung in einer SDS-PAGE oder auf der HPLC zu ermöglichen. Nach Verdau der β -MHC befindet sich dieser Aminosäureaustausch in einem kleineren Peptid, dessen Eigenschaften sehr wohl durch eine Missense-Mutation beeinflusst werden. Die zwei Chromatographieschritte waren notwendig, um die wildtyp und mutierten Peptide in der Mischung der 200 Verdaufragmente identifizieren und freistellen zu können. Besonders die Freistellung der Peptide war nach nur einem HPLC-Schritt noch nicht erreicht (Abbildung 5.2 und Abbildung 5.10).

Bis dato wurde außer der hier verwendeten nur eine weitere Methode veröffentlicht, mit der mutiertes und wildtyp Myosin von FHC-Patienten quantifiziert wurden. Diese Methode nutzte ebenfalls einen Endoproteinaseverdau des Myosins. Er basierte allerdings darauf, dass wildtyp und mutiertes Fragment verschiedene Schnittstellen für das Enzym besaßen und damit unterschiedlich groß waren. Nach elektrophoretischer Auftrennung des gesamten Myosinverdaus, wurde ein Western Blot durchgeführt. Nach der Färbereaktion konnten zwei unterschiedlich weit gelaufene Banden als Wildtyp und Mutante identifiziert werden. Für diese Färbereaktion mussten hochspezifische Antikörper, gegen ein gleiches Epitop der zu untersuchenden Peptide hergestellt werden (Malinchik et al., 1997). Da es in einer vorangegangenen Studie (Nier et al., 1999) nicht gelungen war, spezifische Antikörper für eine weiteren Mutation zu produzieren, wurde dieses Verfahren hier nicht in Betracht gezogen.

6.2.2 Myosinisolierung, Identifizierung und Quantifizierung und Kontrollversuche der proteinchemischen Methode

Im Folgenden werden die wichtigsten Schritte der angewandten Methode diskutiert. Für die proteinchemische Quantifizierung hatten vier Versuchsschritte den größten Einfluss auf

die Ungenauigkeit des Ergebnisses: Die Extraktion und der Verdau des Myosins, sowie die eindeutige Identifizierung und Freistellung der zu quantifizierenden Peaks.

Myosinisolierung

Bei der Extraktion sollte möglichst reines Myosin aus Faserbündeln gelöst werden. Eine Verunreinigung mit anderen Sarkomerenproteinen wurde durch zeitliche Limitierung des Extraktionsschrittes gering gehalten. Wie bereits bei Nier beschrieben und durch eigene Versuche bestätigt, ist die Menge an isoliertem Myosin aus den Fasern sehr unterschiedlich und beträgt maximal 50 Prozent (Nier, 1997). Die Myosinmenge aus den verwendeten Faserbündeln reichte teilweise nicht aus, um Peaks von quantifizierbarer Größe zu bekommen. In diesen Fällen musste das Myosin mehrerer Bündel gepoolt werden. Eine Erhöhung der Myosinausbeute würde die Anwendbarkeit der Methode für kleine Probenmengen verbessern. Daher wurde mit Kontrollproben versucht, anstelle einer verlängerten Inkubationszeit mit dem Extraktionspuffer, die zu einer Verunreinigung mit anderen Sarkomerenproteinen führte, zwei kürzere Inkubationen hintereinander durchzuführen. Die Ergebnisse scheinen vielversprechend zu sein, da die Ausbeute erhöht wurde, aber die Verunreinigung nicht übermäßig zugenommen hatten, so dass diese Methode bei zukünftigen Analysen Anwendung finden sollte.

Durch die Mutationen könnte es neben den veränderten physiko-chemischen Eigenschaften zu einer veränderten Struktur der mutierten Myosine kommen. Bei der Mutation im Codon 584 wird die unpolare Glycin-Seitenkette durch die geladene, polare Seitenkette des Arginins ausgetauscht. Im Gegensatz dazu wird bei der Mutation im Codon 719 die geladene, polare Seitenkette des Arginins durch den unpolaren Tryptophanrest ausgetauscht. Durch diese gravierenden Änderungen im mutierten Protein ist eine veränderte Wechselwirkung mit räumlich benachbarten Aminosäuren, die zu einer Strukturänderung führen durchaus vorstellbar. Zu einer Strukturänderung könnte auch die mit den Mutationen verbundenen Nettoladungsänderung der Proteine beitragen. Bei der Gly 584 → Arg Mutation beträgt die Ladungsänderung des Proteins +1, bei der Arg 719 → Trp Mutation -1. Durch die mögliche Strukturänderung könnte das mutierte Myosin ein gegenüber dem Wildtyp grundsätzlich verändertes Extraktions- oder Verdauverhalten zeigen. Die Mutante könnte sich schwerer aus den Faserbündeln herauslösen lassen oder eine für das Enzym unzugängliche Konformation annehmen, die eine Spaltung erschwert.

Da das Verhältnis von Wildtyp zu mutiertem Myosin bestimmt werden sollte, war es wichtig dass Wildtyp und Mutante bei der Extraktion des Myosins aus Faserbündeln in gleichem Maße herausgelöst wurden. Da dies nicht nachprüfbar war, wäre eine Möglichkeit gewesen, das gesamte Myosin zu extrahieren. Da die Extraktion zeitlich begrenzt wird, um keine Proteinkontaminationen zu erhalten, konnte durch Komplettextraktion keine Abhilfe geschaffen werden. Eine Punktmutation im Kopf des Myosins sollte allerdings keine Auswirkung auf das Extraktionsverhalten haben, wenn dazu ein Puffer hoher Ionenstärke verwendet wird. Durch die Mutation wird das Lösen der Bindung des Myosinkopfes vom Aktin durch das ATP des Extraktionspuffers nicht beeinträchtigt. Sogar die elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen den Schwanzteilen des Moleküls können durch den hohen Salzgehalt gelöst werden.

Um eine nachweisbare Proteinmenge für die Quantifizierung der Lys-C Fragmente zu erhalten, sollte der Verdau des Myosins vollständig sein. Wildtyp und mutiertes Fragment müssen aber vor allem in gleichem Maße gebildet werden. Dies kann angenommen werden, da beide Fragmente die gleichen Schnittstellen für Lys-C und damit die gleiche Länge besitzen. Zusätzlich wurde der Verdau mit LC-MS Analyse überprüft. Waren größere Fragmente vorhanden, die auf einen unvollständigen Verdau hinwiesen, wurde die Probe nochmals für 24 Stunden verdaut. Die HPLC-Spektren der Myosinverdaue gleicher Proben waren genau reproduzierbar und stimmten überein, wenn die gleiche Methode zur Auftrennung benutzt wurde.

Identifizierung und Quantifizierung der gesuchten Peptide

Nach der Auftrennung des Verdau im ersten HPLC-Schritt wurden die Fraktionen mit Wildtyp und mutiertem Peptid gepoolt. Diese Fraktionen wurden durch Vergleich mit den Retentionszeiten der entsprechenden synthetischen Peptide identifiziert. Die massenspektroskopische Überprüfung zeigte, dass zur Sicherheit eine Fraktion davor und danach berücksichtigt werden sollte, um das gesamte Eluat des Peptids zu erhalten. Die gesuchten Peptide könnten in der Matrix der weiteren Verdaufragmente leicht veränderte Retentionszeiten im Vergleich zu denen der allein aufgetrennten synthetischen Peptide haben.

Sowohl während der HPLC als auch während der CE kam es immer wieder zu leicht veränderten Retentionszeiten der Peptide, wobei der relative Abstand der Peptide zueinander gleich blieb. Verursacht wird dies üblicherweise durch eine Alterung der

Laufmittel und Puffer, durch den Äquilibriumszustand der Säule/Kapillare oder durch die Zusammensetzung und den Zustand der untersuchten Probe. Um dennoch die Retentionszeiten vergleichen zu können, wurden die synthetischen Peptide als Vergleichssubstanzen direkt vor oder nach, also in zeitlicher Nähe zu den analysierenden Chromatographien aufgetrennt.

Für eine verlässliche Quantifizierung der Peptide im zweiten Chromatographieschritt mussten die richtigen Peaks identifiziert werden und es musste sichergestellt werden, dass die jeweiligen Peaks nur durch ein Peptid gebildet wurden. Hierzu wurde das Verfahren der Koelution und Überprüfung durch Massenspektrometrie benutzt. Im ersten Teil wurden die Peptide durch den Vergleich ihrer Retentionszeit mit der Retentionszeit der Vergleichssubstanzen identifiziert. Die ausgewählten Fraktionen wurden dann auf die Massen der gesuchten Peptide hin untersucht. Danach wurde die Vergleichssubstanz den zusammengeführten Fraktionen von wildtyp und mutiertem Peptid zugeführt und es wurde erneut chromatographiert. Der zweite Chromatographieschritt musste dabei unter anderen Bedingungen als der erste erfolgen, um eine weitere Auftrennung zu erreichen. Dafür wurde im Fall der Gly 584 → Arg Mutation die CE benutzt und im Fall der Arg 719 → Trp Mutation eine andere HPLC-Säule mit einem anderen Lösungsmittel. Die gesuchten Peaks durften sich durch den Zusatz der Vergleichssubstanz nur erhöhen und es durfte keine Schulterbildung eintreten. Mit diesem Verfahren wurden die gesuchten Peaks über zwei Chromatographieschritte hinweg verfolgt und identifiziert. Zusätzlich wurden die ausgewählten Fraktionen im ersten Schritt massenspektroskopisch überprüft, so dass es sich mit aller Wahrscheinlichkeit um die gesuchten Peptide handelte.

Alternativ könnte die massenspektroskopische Analyse entfallen. Das Eluat der Probe mit dem Zusatz der Vergleichssubstanz könnte aufgefangen werden und in einem dritten Chromatographieschritt aufgetrennt werden. Hierbei sollten wieder andere Chromatographiebedingungen als bei den vorangegangenen Schritten gewählt werden. Zur eindeutigen Identifizierung müssen das gesuchte Peptid und die Vergleichssubstanz weiterhin einen Peak bilden und dürfen sich nicht auftrennen (Gottwald, 1993). Da durch jeden Chromatographieschritt die Probenmenge reduziert wurde und bereits mit sehr geringen Ausgangsmengen gearbeitet wurde, konnte diese Methode nicht angewendet werden. Nach einer dritten Chromatographie konnten keine eindeutigen Peaks mehr erhalten werden.

Der letztendliche Beweis, dass ein bestimmter Peak nur das Wildtyp oder mutierte Peptid enthält können neuere Analyseverfahren ermöglichen, die daher bei zukünftigen Untersuchungen Anwendung finden sollten. Mit einem Ionenfallen-Massenspektrometer kann einer von mehreren Peaks direkt massenspektroskopisch untersucht werden. Nach der Zusammenführung mehrerer HPLC-Fraktionen, kann also der gesuchte Peak auf seine Masse analysiert werden, um zu prüfen, ob er nur von einem Peptid gebildet wird. Zur Sicherheit kann das gesuchte Peptid noch massenspektroskopisch sequenziert werden, so dass der Zusatz von Vergleichssubstanzen entfallen würde. Dies würde auch einen Analyseschritt sparen und die Methode schneller machen.

Nach einer eindeutigen Identifizierung der Wildtyp und mutierten Peaks wurden die entsprechenden Flächen zueinander ins Verhältnis gesetzt. Hierfür sollten diese Peaks von den anderen vorhandenen Peptiden freigestellt sein. Dies konnte bei der Untersuchung des Probenmaterials mit der Arg 719 → Trp Mutation nicht optimal erreicht werden. Bei jedem Myosinverdau ist die Matrix jedoch ähnlich komplex, so dass dieses Problem sich für folgende Untersuchungen immer wieder ergeben wird und oft eine langwierige Methodenoptimierung zur Folge hat. Eine Lösung könnte eine massenspektroskopische Quantifizierung bieten. Die Quantifizierung würde dann über den Wildtyp- und Mutanten-Peak in einem Massenspektrum erfolgen. Das Gerät kann dabei so eingestellt werden, dass nur die gesuchten Massen aufgezeichnet werden und die Matrix anderer Peptide nicht mehr stört. Dieses Verfahren ist allerdings noch in der Entwicklung.

Kontrollversuche

Um zu verifizieren, dass sich Wildtyp und mutierte Peptide während der Untersuchungen gleich verhielten, wurden ihre UV-Absorption und ihr Adsorptionsverhalten an Oberflächen, mit denen sie während der Analyse in Kontakt kamen, wie zum Beispiel Oberflächen von Reaktionsgefäßen, untersucht.

Für das Wildtyp Peptid der Gly 584 → Arg Mutation musste die UV-Absorption bei 200 nm mit einem Wert von 1,1 multipliziert werden, für das Wildtyp Peptid der Arg 719 → Trp Mutation betrug der Korrekturfaktor 1,8 bei 215 nm. Da die Peptide zur Vermessung in gleicher Menge eingesetzt wurden, gleich lang waren und in einem Wellenlängenbereich aufgezeichnet wurde, in dem nur die Peptidbindungen absorbieren, sollte die gemessene Absorption beider Peptide gleich groß sein. Offensichtlich muss die Änderung der einen Seitenkette doch einen Einfluss haben. Dies ist besonders im Falle des

Austausches von Arginin gegen das aromatische Tryptophan sichtbar, da dort ein Korrekturfaktor von 1,8 notwendig war.

Zur Überprüfung des möglicherweise unterschiedlichen Adsorptionsverhaltens an Kontaktflächen der wildtyp und mutierten Peptide beider Mutationen wurden Kontrollversuche durchgeführt (Abschnitt 5.1.5). Das Ergebnis dieser Versuche war, dass das eingesetzte Verhältnis von wildtyp und mutiertem Peptid, mit einer Abweichung von 17 Prozent für die Gly 584 → Arg Mutation und 16 Prozent für die Arg 719 → Trp Mutation, nach allen Analyseschritten wiedergefunden werden konnte. Keines der Peptide adsorbierte während der verschiedenen Chromatographie- und Lyophilisationsschritte deutlich stärker als das andere an Oberflächen, mit denen es in Kontakt kam.

Trotz der Verwendung von silikonisiertem Verbrauchsmaterial wurde bei den Versuchen zur Weiterentwicklung der Methode ein besonders starkes Adsorptionsverhalten der Peptide mit der Arg 719 → Trp Mutation beobachtet. Dies fiel bei einer Absolutmengenbestimmung der Peptide auf. Durch das Adsorptionsverhalten kann es zu großen Materialverlusten bei jedem Analyseschritt, besonders bei den Lyophilisierungsschritten kommen (siehe Abschnitt 6.2.3).

6.2.3 Vergleich der proteinchemischen Quantifizierung der Proben mit der Gly 584 → Arg Mutation (Patient H 2) mit Proben mit der Arg 719 → Trp Mutation (Patient H 13)

Die Versuche mit der Probe mit der Arg 719 → Trp Mutation (Patient H 13) führten zu mehr Problemen, als bei den Untersuchungen der Val 606 → Met (Patient H 5) und Gly 584 → Arg (Patient H 2) Proben auftraten. Dies spiegelt sich auch in der viel höheren Standardabweichung als bei dem Ergebnis der Gly 584 → Arg Probe wieder. Die bisher verwendete Untersuchungsmethode liefert für diese Mutation stark schwankende Ergebnisse.

Bereits die synthetischen Peptide zeigten starke Adsorptionserscheinungen, so dass ohne Einsatz von silikonisiertem Material keine gleich großen Peaks bei gleicher eingesetzter Peptidmenge auf der HPLC erhalten werden konnten. Dies kann nicht mit der Art des Aminosäureaustausches erklärt werden, da bei beiden Mutationen jeweils ein Peptid eine unpolare und eine geladene, polare Seitenkette besitzt. Wildtyp und mutiertes Peptide mit der Arg 719 → Trp Mutation sind allerdings grundsätzlich andere Verdaufragmente als die

Peptide mit der Gly 584 → Arg und auch der Val 606 → Met Mutation, dass heißt sie haben eine grundsätzlich andere Aminosäurezusammensetzung (siehe Abschnitt 4.1.3).

Ein Vergleich mit der Gly 584 → Arg Mutation ergab, dass die Peptide mit der Arg 719 → Trp Mutation im LC-MS Lauf schwerer bis gar nicht im Myosinverdau nachweisbar waren. Eigentlich werden alle Peptide in äquimolaren Mengen gebildet. Eine mögliche Erklärung wäre, dass sich die Peptide in für Proteasen unterschiedlich leicht zugänglichen Bereichen des Myosins befinden. Bei einem nicht vollständigen Myosinverdau könnten sie unterschiedlich herausgeschnitten werden. Die zweite Erklärungsmöglichkeit wäre ein stark unterschiedliches Adsorptionsverhalten der Peptide. Im Laufe weiterer Versuche zur Methodenoptimierung für die Arg 719 → Trp Mutation zeigte sich, dass die Adsorptionserscheinungen allein durch die Verwendung silikonisierter Materialien nicht vollständig ausgeschaltet werden konnten. Bei gleicher eingesetzter Menge von wildtyp und mutiertem Peptid wurden gleiche Flächen erhalten, jedoch konnte die Flächengröße, also die Absolutmenge an Peptid, nicht ausreichend zuverlässig reproduziert werden. Erst ein Zusatz von 25 Prozent Acetonitril zu allen Lösungen mit dem der Myosinverdau bzw. die Peptide in Kontakt kamen löste das Problem. Beim Einsetzen gleicher Peptidmengen ergaben sich ebenso große Peaks wie bei den Peptiden der Gly 584 → Arg Mutation.

Dieses Adsorptionsverhalten erklärte, warum die Peptide der Arg 719 → Trp so schwer nachweisbar waren (siehe oben), obwohl sie in der gleichen Menge wie die der Gly 584 → Arg Mutation vorhanden sein mussten. Jeder Kontakt der Peptide mit einer Reaktionsgefäßwand führte zu Materialverlust. Besonders entscheidend könnte dabei auch die durch starke Adsorption möglicherweise unvollständige Resolvatisierung des Peptidpellets nach einem Lyophilisationsschritt sein. Im gesamten Analyseverfahren gab es vier Lyophilisierungsschritte.

Neben der Problematik, die sich aus dem physiko-chemischen Verhalten der Peptidfragmente ergab, zeigte die Patientenprobe weitere unerwartete Eigenschaften. Wurde eine Methode zur Freistellung von wildtyp und mutiertem Peptid mit Hilfe von Kontrollmaterial und Zusatz von synthetischen Peptiden optimiert, schlug die Anwendung bei der Realprobe fehl. Es zeigte sich, dass wahrscheinlich durch Regenerationsprozesse in der Muskulatur neben Fasern mit dem β -kardialen Myosin noch andere Fasertypen mit anderen Myosinisoformen in dieser Probe enthalten waren. Außer der β -MHC wurden

damit noch weitere Myosine isoliert und verdaut, die zu einer komplexeren Hintergrundmatrix führten, als es bei den Proben des Patienten H 2 mit der Gly 584 → Arg Mutation der Fall war. Daher wurden die Peaks der Arg 719 → Trp Untersuchung wahrscheinlich nicht optimal freigestellt. Neben den beschriebenen Methoden wurden an Kontrollmaterial weitere Gradienten und Säulenkombinationen ausprobiert, wobei jedoch kein Ergebnis erhalten wurde, das eine Anwendung an wertvollem Patientenmaterial zuließ.

Für zukünftige Messungen wird eine Methode mit einem Ionenfallen-Massenspektrometer optimiert. Mit dieser Methode und einem Zusatz von Acetonitril sollen die Proben des Patienten H 13 mit der Arg 719 → Trp Mutation nachuntersucht werden, um eine verlässlichere Aussage über den Gehalt an mutierter β -MHC machen zu können. Auf diese Weise kann dann hoffentlich ebenfalls eine bessere Identifizierung der Masse der Mutanten-Ionen erhalten werden.

Somit kamen wir zu der Schlussfolgerung, dass die verschiedenen, zu quantifizierenden Verdaufragmente sich während der Analyse sehr unterschiedlich verhielten. Eine universelle Analyseverfahren kann es daher nicht geben. Für jede neu zu untersuchende Mutation muss die Methode grundsätzlich neu adaptiert werden.

6.3 Diskussion der Methode zur mRNA-Quantifizierung

6.3.1 Extraktion von Total-RNA, reverse Transkription, PCR und Restriktionsverdau

Die entscheidenden Schritte für die Richtigkeit der Bestimmung des Anteils mutierter mRNA am Gesamtgehalt der β -MHC mRNA sind die Extraktion der Total-RNA und Umschreibung in cDNA, sowie der Restriktionsverdau der PCR-Produkte.

Die Extraktionsmethode mit TRIzol lieferte höchstens wenig degradierte RNA, wie die deutlichen Banden der 28S und 18S rRNAs und deren 2:1 Absorptionsverhältnis in Abbildung 5.22 zeigen. Die Methode wurde sowohl für die nativen Muskelbiopsien mit der Val 606 → Met Mutation als auch für die nativen Proben mit der Arg 719 → Trp Mutation benutzt. Durch das denaturierende Agarosegel kann nur die Integrität der Total-RNA, jedoch nicht speziell die β -MHC mRNA überprüft werden. Aus der Total-RNA wurde mit einem genspezifischen Primer die gesuchte mRNA revers transkribiert. Da mit der

reversen Transkription keine Vervielfältigung einhergeht, konnte die β -MHC cDNA aufgrund ihrer geringen Menge, relativ zur Menge an Total-RNA betrachtet, nicht auf einem Gel überprüft werden.

Ein großer Schwachpunkt jeder RT-PCR Methode ist die geringe Gesamteffizienz der reversen Transkription. Es wird nur etwa 10 bis 30 Prozent der vorhandenen RNA in cDNA umgeschrieben (Haberhausen, 1998). Dies liegt vor allem an der geringen Prozessivität der Reversen Transkriptase, wodurch es zu unvollständigen Transkripten kommen kann. Um die Reaktion optimal durchzuführen, wurde durch die Lage des genspezifischen RT-Primers nur ein kurzer Abschnitt der β -MHC mRNA transkribiert.

Für die durchgeführte mRNA-Analyse war es vor allem wichtig, dass mutierte und wildtyp mRNA in gleichem Maße aus dem Gewebe extrahiert werden konnten und in gleichem Maße in cDNA umgeschrieben wurden. Ob dies der Fall war, konnte nicht überprüft werden. Die Mutation könnte zu einer veränderten Sekundärstruktur der mutierten mRNA führen, so dass das Extraktionsverhalten schlechter als beim Wildtyp sein könnte. Die Umschreibung in cDNA sollte durch einen Basenaustausch nicht beeinträchtigt werden, da alle Sekundärstrukturen der Transkripte durch Denaturierung zerstört wurden. Sowohl vor der reversen Transkription als auch vor der PCR wurden die Proben durch Erhitzen denaturiert.

Die Korrektheit der cDNA im untersuchten Bereich wurde mit PCR überprüft. Es wurde ein einziges, spezifisches PCR-Produkt der richtigen Größe erhalten. Somit konnte darauf geschlossen werden, dass die isolierte RNA intakt war, korrekt in cDNA umgeschrieben wurde und die PCR spezifisch, ohne Amplifizierung genomischer DNA, durchgeführt wurde.

Die PCR zeigte ebenfalls, dass die Primer korrekt ausgewählt wurden und hochspezifisch hybridisierten. Um nur die β -MHC cDNA zu amplifizieren und nicht verunreinigende genomische DNA, wurde mindestens ein Primer über einer Spleißstelle positioniert. Um die möglicherweise transkribierte, zur β -MHC hoch homologe α -MHC cDNA nicht zu amplifizieren, wurden Stellen mit Sequenzunterschieden für die Primerposition gewählt. Es wurde ein möglichst kurzes PCR-Produkt konstruiert, um die Fehlerrate der DNA-Polymerase zu minimieren. Da ein *proofreading* Enzym eingesetzt wurde, war diese Fehlerrate ohnehin schon sehr gering. Zusätzlich wurde die Spezifität der PCR durch die

Verwendung der Heißstart-Methode erhöht. Diese Maßnahmen führten für die beiden untersuchten Proben zu nur einem, also spezifischen, PCR Produkt der richtigen Größe.

Durch die Amplifizierung von Wildtyp und mutierter cDNA mit dem gleichen Primerpaar in dem gleichen Reaktionsansatz konnte sichergestellt werden, dass die nach dem Restriktionsverdau quantifizierten Mengen der für Wildtyp und die Mutante charakteristischen Fragmente unter den gleichen Reaktionsbedingungen entstanden war.

Um das Verhältnis von Wildtyp zu Mutante korrekt bestimmen zu können, mussten die PCR-Produkte vollständig verdaut sein. Bei dem Restriktionsverdau waren prinzipiell drei Fehler möglich: 1. Das PCR-Produkt von Wildtyp und/oder Mutante wurde gar nicht verdaut. 2. Das PCR-Produkt wurde nur an der ersten Schnittstelle geschnitten. 3. Das PCR-Produkt wurde nur an der zweiten Schnittstelle geschnitten. Der erste Fehler konnte durch die Abwesenheit unverdauter Banden in Größe der erwarteten PCR-Produkte ausgeschlossen werden. Der zweite Fehler konnte für die Mutante von H 13 (Arg 719 → Trp Mutation) und den Wildtyp von H 5 wiederum durch Abwesenheit einer Bande in der Größe des jeweiligen PCR-Produktes ausgeschlossen werden. Der Wildtyp von H 13 und die Mutante von H 5 (Val 606 → Met Mutation) müssten bei nicht geschnittener erster Schnittstelle eine neue, unerwartete Bande zeigen. Da eine solche Bande nicht sichtbar war, konnte dieser Fehler ebenfalls ausgeschlossen werden. Der dritte Fehler konnte nur bei den PCR-Produkten mit zwei Restriktionsschnittstellen auftreten, bei dem Wildtyp von H 13 und der Mutante von H 5 (Val 606 → Met Mutation). Würde die zweite Schnittstelle dieser PCR-Produkte nicht geschnitten, würden die entstehenden Bruchstücke fälschlicher Weise als korrespondierende Mutante oder korrespondierender Wildtyp identifiziert werden. Verdaute und halbverdaute PCR-Produkte könnten nicht unterschieden werden. Da jedoch keiner der ersten zwei Fehler aufgetreten war und in keinem Fall unerwartete Banden zu sehen waren, konnte daraus indirekt geschlossen werden, dass auch die dritte Möglichkeit der Fehlsplaltung nicht stattgefunden hat und der Verdau vollständig war (vergleiche Abbildung 5.20 und Abbildung 5.24).

Eine gute Fehlerabschätzung für die Genauigkeit der Methode lieferte die Analyse von Wildtyp Kontrollproben (Abschnitt 5.2.3). Mit diesen Proben wurde die gesamte Prozedur von der Total-RNA-Extraktion bis zur abschließenden Auswertung des Restriktionsverdau auf einem Agarosegel durchgeführt. Es wurde eine relative Genauigkeit von +/- 23 % ermittelt. Insgesamt betrachtet konnten mit dieser Methode gut reproduzierbare Ergebnisse erhalten werden, was aus der geringen Standardabweichungen

(+/- 0,9 % für die Proben mit des Patienten H 13 mit der Arg 719 → Trp Mutation, +/- 2,7 % für die Proben des Patienten H 5 mit der Val 606 → Met Mutation) ersichtlich ist.

6.3.2 Diskussion einer quantitativen PCR-Methode

Während der Arbeit wurde auch die Verwendung einer quantitativen PCR-Methode mit *real-time* Detektion diskutiert. Diese Methode hat ihre Stärke in der Bestimmung von Absolutmengen an DNA. Unser Ziel war es aber, das Verhältnis von wildtyp zu mutierter mRNA zu bestimmen. Da alle Arbeitsschritte bis zum Erhalt der cDNA gleich geblieben wären, blieben auch die Hauptfehlerquellen, wie die möglicherweise unterschiedliche Extraktion von wildtyp und mutierter mRNA, sowie die ineffiziente und möglicherweise unterschiedliche reverse Transkription von Wildtyp und Mutante erhalten.

Nach einer quantitativ durchgeführten PCR, müssten Wildtyp und Mutante dann unterscheidbar sein. Dies kann bei der Lightcycler-Methode über die Bestimmung von Schmelzkurven geschehen. Eine Sonde, die genau auf den Wildtyp passt, hätte eine Fehlpaarung auf dem mutierten Allel und würde eine Änderung der Schmelztemperatur von ungefähr 4°C bewirken. Die Schmelzkurven einer Mischung zweier Allele würde zwei unterschiedliche Kurven erzeugen. Dieses Verfahren wird zur Gentyptisierung benutzt (*genotyping*). Ob eine quantitative Auswertung der Schmelzkurven zur Bestimmung des Verhältnisses von Wildtyp zu Mutante möglich wäre, ist unbekannt. Zusätzlich wurde in Internet-Foren diskutiert (<http://groups.google.com>, 1999-2001), dass die in Frage kommende, relativ neue Lightcycler-Methode Probleme mit der Reproduzierbarkeit habe. Es wurde außerdem von schnellem und unerwartetem Zerfall der zugehörigen Reaktionslösungen berichtet.

Die hier verwandte Quantifizierungs-Methode hat den großen Vorteil, dass in ein und demselben Reaktionsansatz wildtyp und mutierte cDNA mit dem gleichen Primerpaar amplifiziert wurden. Dadurch waren die Reaktionsbedingungen für die zwei Spezies identisch, deren Mengenverhältnis abschließend ausgewertet wurde. Fehler die durch unterschiedliche Reaktionsbedingungen entstehen könnten, bei dem die cDNA des einen Allels anders amplifiziert würde als die des anderen, konnten so ausgeschlossen werden. Dieser Vorteil würde durch die Verwendung von Sonden, die die spezifischen Unterschiede der cDNAs durch die Mutation ausnutzen, zunichte gemacht.

Insgesamt betrachtet haben wir daher keine größere Genauigkeit der Ergebnisse erwartet, als sie die densitometrischen Analyse des Restriktionsverdaus liefert. Das Lightcycler-

Verfahren könnte aber eine gute Möglichkeit bieten, wenn durch eine Mutation keine Schnittstelle eines Restriktionsenzym verändert wird.

6.4 Mechanismen der Abweichung vom 1:1 Verhältnis der DNA-Ebene während der Genexpression

Bei einem heterozygoten Patienten mit einer autosomal dominanten Erbkrankheit wie FHC, sind auf DNA-Ebene ein wildtyp und ein mutiertes Allel vorhanden. Wildtyp und mutierte DNA liegen also in einem Verhältnis von 50 Prozent zu 50 Prozent vor. Aus diesem Grund, scheinbar bestätigt durch die Bestimmung des Gehaltes an mutiertem Myosin aus Muskelfasern diverser FHC-Patienten mit der Arg 403 → Gln Mutation (Malinchik et al., 1997), wurde allgemein angenommen, dass wildtyp und mutiertes Protein ebenfalls in einem 1:1 Verhältnis exprimiert werden müssten. In dieser Arbeit wurde bei einem zweiten Patienten, mit der Gly 584 → Arg Mutation (Patient H 2), gezeigt, dass ein sehr viel geringerer Gehalt an mutiertem Protein vorliegen kann. Eine verallgemeinernde Aussage über den Gehalt an exprimiertem Protein ist daher für FHC nicht zulässig.

Zusätzlich wurde untersucht, ob diese abweichenden Gehalte an mutiertem Myosin ein Phänomen der Translation sind, oder schon früher im Verlauf der Genexpression entstehen. Es zeigte sich bei dem Patienten H 5 mit der Val 606 → Met Mutation, dass diese Abweichung von der 1:1 Anlage der beiden Allele bereits auf mRNA-Ebene entstehen kann. Bei dem Patienten H 13 mit der Arg 719 → Trp Mutation konnte auf mRNA-Ebene innerhalb der Fehlergrenzen wahrscheinlich das gleiche 1:1 Verhältnis von Wildtyp und Mutante wie auf DNA-Ebene nachgewiesen werden.

Patienten mit gleicher Mutation müssen nicht gleiche Anteile an mutiertem Protein haben. Die hier ermittelten Ergebnisse werden als individuelle Werte einzelner Patienten betrachtet und sollen nicht verallgemeinert werden.

Die ermittelten Myosinverhältnisse, im Verlauf der Genexpression, sind in Abbildung 6.1 dargestellt.

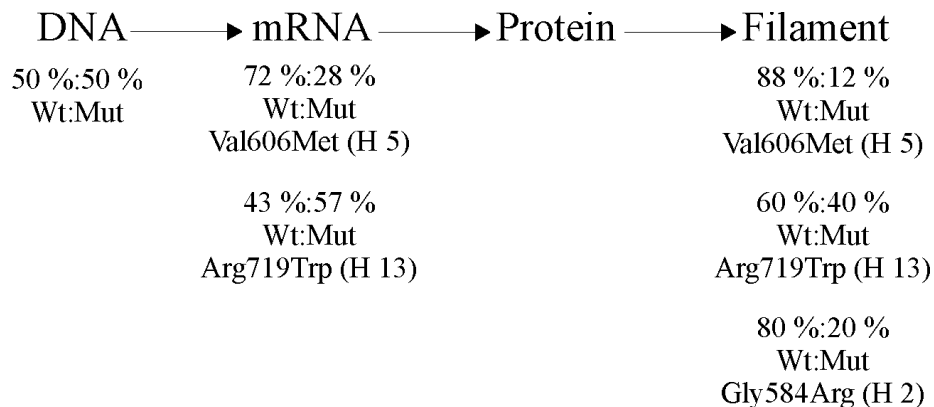


Abbildung 6.1 Bekannte Verhältnisse der β -MHC-Genexpression und Ergebnisse der Arbeit.

Die bekannten Verhältnisse von wildtyp und mutierter β -MHC auf DNA- und Filamentebene. Bei einem gering betroffenen Patienten mit der Val 606 \rightarrow Met Mutation wurde mit 12 % ein überraschend geringer Anteil an mutierter β -MHC gefunden (Nier et al., 1999). Bei einem weiteren Patient (Gly 584 \rightarrow Arg Mutation) mit mildem Phänotyp wurden 20 % mutierte β -MHC ermittelt. Der Gehalt an mutierter β -MHC bei einem schwer betroffenen Patienten (Arg 719 \rightarrow Trp) betrug 40 %.

Das Anteil mutierter an der Gesamt- β -MHC mRNA wurde für die Patienten H5 mit der Val 606 \rightarrow Met und H 13 mit der Arg 719 \rightarrow Trp Mutation ermittelt. Der Anteil an mutierter mRNA betrug 28 % für H 5 und 57 % für H 13.

Im Folgenden werden die Möglichkeiten diskutiert, wie es zu den beobachteten Abweichungen vom auf DNA-Ebene angelegten 1:1 Verhältnis von wildtyp zu mutiertem Allel kommen könnte. Die Ergebnisse des Patienten H 5 mit der Val 606 \rightarrow Met Mutation zeigen, dass diese Abweichung bereits auf mRNA-Ebene, also auf Transkriptionsebene entstehen kann. Möglicherweise kann zusätzlich noch eine Abweichung auf Translationsebene stattfinden. Dagegen deuten die Ergebnisse des Patienten H 13 mit der Arg 719 \rightarrow Trp Mutation daraufhin, dass sowohl auf mRNA- als auch auf Filamentproteinebene das 1:1 Verhältnis von wildtyp und mutiertem Allel erhalten bleiben kann.

6.4.1 Transkriptionsebene

Die erste Stelle, an der es zu einer Abweichung des 1:1 Verhältnisses von wildtyp und mutiertem Allel kommen kann, ist die Transkription. Das gemessene Verhältnis an β -MHC mRNA wird durch die DNA-Transkriptionsrate und die Abbaurrate der mRNA bestimmt.

An der Transkriptionskontrolle von Eukaryonten sind die Interaktionen sogenannter Cis- und Trans-Elemente beteiligt. Auch die Konformation der DNA kann regulierend auf die Transkription wirken.

Als Cis-Elemente werden regulatorische Sequenzen bezeichnet, die sich auf demselben DNA-Molekül wie das regulierte Gen befinden. Bis jetzt sind Promotor, Enhancer- und Silencer-Sequenzen als Cis-Elemente bekannt. Promotor und Enhancer-Sequenzen wurden bis jetzt nur außerhalb kodierender Genabschnitte nachgewiesen. Trans-Elemente sind Genprodukte anderer DNA-Moleküle, wie Transkriptionsfaktoren, die mit Cis-Elementen wechselwirken. Da die hier untersuchten Mutationen in der kodierenden Sequenz der β -MHC liegen, ist deren Einfluss auf Promotor, Enhancer-Sequenzen oder Trans-Elemente wahrscheinlich ausgeschlossen. Über Silencer-Sequenzen ist sehr wenig bekannt. Generell reduzieren sie die Effizienz der Transkription. Bei einigen Genen liegen diese Sequenzen innerhalb der ersten Introns, so dass das Vorkommen solcher Sequenzen auch in Exons, den kodierenden Genbereichen, denkbar wäre. Sollte eine der hier untersuchten Mutationen in einer Silencer-Sequenz liegen, könnte eine Wechselwirkung mit einem dort angreifenden Trans-Element beeinflusst werden. Das Trans-Element könnte stärker oder schwächer gebunden werden und damit die transkriptionshemmende Wirkung bei der Mutante verstärken oder schwächen.

Die Konformationen der DNA, die an der Transkriptionskontrolle beteiligt sein können, sind das Bending von DNA und die Supercoil-DNA. Als Bending von DNA wird die Fähigkeit bezeichnet, eine gekrümmte Konformation einzunehmen. Diese kann intrinsisch oder Protein-induziert sein. An dem Protein-induziertem Bending sind zumeist Transkriptionsfaktoren beteiligt, das intrinsische Bending tritt bei DNA-Fragmenten auf, bei denen mehrere oligo(dA-dT)-Anteile in Abständen von einer oder mehrerer ganzzahliger Windungen der DNA-Doppelhelix vorkommen. Eine mögliche Ursache für eine verringerte Transkription des β -MHC Gens wäre also, dass die untersuchten Punktmutationen sich negativ auf die Konformation der DNA auswirken. Da es bei den Mutationen im Codon 606 zu einem G \rightarrow A und im Codon 719 zu einem C \rightarrow T Austausch kommt, könnte das intrinsische Bending durch Änderungen in den wichtigen oligo(dA-dT)-Bereichen verändert werden. Wenn die Proteine, die Bending induzieren mit kodierenden DNA-Sequenzen wechselwirken, wäre auch hier eine transkriptionshindernde Konformationsänderung durch eine Punktmutation denkbar. Wie die Punktmutation Einfluss auf die supercoiled DNA-Konformation haben könnte, bleibt unklar. Insgesamt ist

es eher unwahrscheinlich, dass eine einzige Punktmutation im kodierenden Bereich eines Gens, der insgesamt nur drei Prozent einer DNA ausmacht, überhaupt eine Wirkung auf deren Konformation haben kann und darüber die Transkription beeinflussen kann. Da jedoch wenig über Transkriptionskontrolle bekannt ist, kann dieser Mechanismus nicht grundsätzlich ausgeschlossen werden.

Außer durch die Translationsrate, wird der Gehalt an mRNA durch deren Degradationsrate bestimmt.

Die Stabilität von mRNA wird durch die Länge ihres Poly-A-Schwanzes und die Integrität ihrer Cap-Struktur bestimmt. Eine mRNA mit verkürztem Poly-A-Schwanz oder ohne Cap-Struktur wird schneller als andere mRNAs abgebaut. Welche Faktoren auf die Integrität des Poly-A-Schwanzes und die Cap-Struktur Einfluss haben ist relativ unbekannt. Obwohl die beschriebenen Punktmutationen primär keinen dieser Bereiche betreffen, wäre es vorstellbar, dass die Mutationen die Struktur der mRNA verändern. Ein mRNA-Degradationssystem (*mRNA surveillance*) könnte die mRNA als fehlerhaft erkennen und eine Degradation über die Verkürzung des Poly-A-Schwanzes oder den Abbau der Cap-Struktur einleiten (Hilleren and Parker, 1999; Ibba and Soll, 1999).

Nach der Prozessierung bindet die reife mRNA an Transportproteine, um aus dem Zellkern ins Cytosol geschleust zu werden. Ein geringere Gehalt an mRNA könnte also auch durch einen verminderten Transport ins Cytosol verursacht werden. Die Mutation müsste auf noch unbekanntem Wege ihren Transport behindern, z.B. indem die Kontaktstelle für die Transportproteine verändert wird oder die mRNA sich derart faltet, dass eine Interaktion mit den Transportproteinen reduziert bzw. nicht mehr möglich ist.

Dass es bei den untersuchten FHC Missense-Mutationen zu veränderten mRNA-Sekundärstrukturen kommen kann, wurde bereits bei dem Patienten H5 mit der Val 606 → Met Mutation gezeigt. Die Mutation wurde durch eine SSCP-Analyse (single stranded conformation polymorphism) der β -MHC cDNA entdeckt (Fananapazir and Epstein, 1994). Diese Methode nutzt die Konformationsunterschiede von mutierter und wildtyp cDNA aus, die zu einem veränderten Laufverhalten der Einzelstränge im Polyacrylamidgel führen. Obwohl die cDNA vor dem Auftragen auf das Gel denaturiert wurde, zeigt dieser Versuch, dass mutierte und wildtyp cDNA und damit auch deren mRNA, eine unterschiedliche Konformation annehmen können.

6.4.2 Translationsebene

Die nächste Möglichkeit der Abweichung vom 1:1 Verhältnis der DNA-Anlage von Wildtyp und Mutante ergibt sich auf Translationsebene. Die Menge an gemessenem Protein wird, wie die mRNA-Menge, durch das Verhältnis von Synthese- zu Abbauraten bestimmt. Es sind also eine geringere Translationsrate oder eine erhöhte Abbauraten des mutierten Proteins denkbar.

Die Translation wird auf der Stufe der Initiation reguliert. Bei der Bildung des Initiationskomplexes müssen die 30S-Untereinheit des Ribosoms, die Initiator-tRNA, die Initiationscodons der mRNA, GTP und einige Initiationsfaktoren assoziieren. Eine Möglichkeit, wie verringerte Translationsraten entstehen können, sind Missense-Mutationen im Initiationscodon. Das Initiationscodon befindet sich jedoch am vordersten 5'-Ende der mRNA z.B. in Exon 1 (Choong et al., 1996). Die hier untersuchten Mutationen befanden sich jedoch in den Exonen 15, 16 und 19, so dass ein Einfluss auf die Ausbildung des Initiationskomplexes unwahrscheinlich ist.

Durch die Initiationsfaktoren wird die Sekundärstruktur der 5'-untranslatierten Region der mRNA entwunden, wovon die Effektivität der Translation maßgeblich beeinflusst wird (Brown and Schreiber, 1996). Eine Punktmutation in diesem Bereich ist bei den untersuchten FHC-Patienten nicht gefunden worden, so dass auch an dieser Stelle kein Einfluss auf die Translationskontrolle ausgeübt wird.

Für die verschiedenen Kompartimente der Zelle wird ein Proteinqualitäts-Kontrollmechanismus diskutiert. Mit diesem System aus Chaperonen und intrazellulären Proteasen sollen die Faltung und das zelluläre Schicksal (*cellular handling*) von neusynthetisierten und fehlerhaft gefalteten Proteinen geregelt und kontrolliert werden. Auf welche Weise ein mutiertes Protein degradiert wird, muss individuell unterschieden werden. Untersuchungen der seltenen Krankheit Short-Chain Acyl-CoA Dehydrogenase Deficiency (SCAD), die fast ausschließlich durch Missense-Mutationen hervorgerufen wird, zeigten, dass das mutierte Protein instabiler als das gesunde war. Diese Instabilität führt zu einer schnellen Degradation durch das mitochondriale Proteinqualitäts-Kontrollsystem (Gregersen et al., 2000). Auch für das mutierte Myosin ist eine veränderte, vielleicht instabile Struktur des Moleküls denkbar. Die veränderte Struktur des Protein könnte zuallererst durch den Aminosäureaustausch und den damit verbundenen Polaritäts- und Ladungsänderungen entstehen. Es könnte zu veränderten Wechselwirkungen mit

räumlich benachbarten Aminosäuren und damit zu einer veränderten Faltung des Proteins kommen. Des Weiteren unterliegen Proteine posttranslationalen Modifizierungen. Fände eine wichtige Modifizierung an der Stelle der Mutation statt und würde dadurch eine veränderte Struktur hervorgerufen, könnte die Folge eine erhöhte oder verringerte Stabilität des Proteins sein. Ein Proteinqualitäts-Kontrollsystem könnte das veränderte Myosin erkennen und degradieren.

Proteine besitzen innerhalb der Zelle unterschiedliche Halbwertszeiten. Eine geringe Halbwertszeit wurde bei den sogenannten PEST-Proteinen beobachtet. Die N-terminalen Aminosäurereste P, E, S und T führen zu einer erhöhten Abbaurrate bei einem Protein. Obwohl der Kopfbereich des Myosins, in dem die untersuchten Mutationen liegen, aus dem N-Terminus der Sequenz gebildet wird, befindet sich keine am Ende oder in der letzten Aminosäure der N-terminalen Myosinsequenz. Ein solcher Mechanismus kann ebenfalls ausgeschlossen werden.

Ein weiterer Mechanismus, mit dem abzubauen Proteine im Körper erkannt werden, ist eine Markierung mit Ubiquitin, welches über Lysinreste kovalent an ein Protein gebunden wird. Allerdings betrifft keine der untersuchten Mutationen ein Lysin, so dass hier keine Ursache für eine möglicherweise erhöhte Abbaurrate liegen sollte. Dennoch könnte der erhöhte Abbau des mutierten Protein nach Ubiquitin-Markierung erfolgen, wobei der Mechanismus, durch welchen fehlerhaft synthetisierte Proteine erkannt und markiert werden bisher allerdings unklar ist.

6.4.3 Filamentebene

Die hier gemessenen Verhältnisse von wildtyp zu mutiertem Myosin wurden aus Filamenten gehäuteter Muskelfasern bestimmt. Es wäre also möglich, dass mehr als der gemessene Anteil an mutiertem Myosin translatiert wurde, aber nicht ins Filament eingebaut wurde.

Für die Filamentbildung ist der Schwanzteil des Myosinmoleküls verantwortlich. Die hier betrachteten Missense-Mutationen befinden sich zwar im Kopf- und Kopf-Hals-Übergangsbereich des Moleküls, trotzdem gibt es Hinweise darauf, dass sie sich negativ auf die Filamentbildung auswirken könnten. In Zellkultur-Modellsystemen verschiedener Spezies wurden zwar widersprüchliche Auswirkungen von mutiertem Myosin beobachtet, in einigen Systemen jedoch zerstören die mutierten Proteine die Sarkomerenstruktur (Becker et al., 1997; Marian et al., 1995). Zusätzlich wurden für das Modellsystem

C. elegans 31 Mutationen im Kopfbereich des Myosins beschrieben, die die Ausbildung dicker Filamente beeinträchtigt haben (Bejsovec and Anderson, 1990). Auch wenn diese Ergebnisse keine eindeutige Aussage über die Wirkung des mutierten Myosins im Menschen erlauben, geben sie Hinweise darauf, dass Mutationen im Kopfbereich des Moleküls die Struktur des Proteins so verändern, dass der Einbau ins Filament erschwert sein könnte.

Wie der Auf- und Abbau der Sarkomerenproteine vor sich geht, ist bis jetzt noch relativ unklar. Müssten die fertigen Proteine zum Beispiel erst zu ihrem Ziel transportiert werden, könnte dieser Mechanismus durch das mutierte Protein beeinträchtigt werden. Dies ist der Fall bei Cystischer Fibrose. Das neu synthetisierte, mutierte Protein kann keine Konformation annehmen, die einen notwendigen intrazellulären Transport ermöglicht. Die Folge ist eine Degradation des Proteins über den Proteinqualitäts-Kontrollmechanismus (Gregersen et al., 2000).

Einige Proteine des Cytoskeletts aggregieren (*assembly*) nicht posttranslational, sondern cotranslational. Bereits während der Translation, als naszierende Proteine, assoziieren sie mit dem Cytoskelett, bevor sie dort aggregieren (*cotranslational assembly*) (Fulton and L'Ecuyer, 1993). Möglicherweise wird dieser Vorgang durch FHC-verursachende Mutationen gestört. FHC wird ebenfalls durch Mutationen im Myosin-Bindenden-Protein-C (MyBP-C) verursacht. In einer Familie wurde eine Mutation an einer Spleißstelle der mRNA gefunden, die zu einem trunkierten Protein führen sollte. Obwohl die mRNA nachgewiesen wurde, konnte kein translatiertes Protein gefunden werden. Die endogene Menge an MyBP-C war ebenfalls nicht in signifikantem Maße reduziert. Da dies eine völlig neue Beobachtung war, wurde spekuliert, dass das mutierte Transkript bereits auf mRNA-Ebene die Ausbildung des Sarkomers beeinflussen kann (Rottbauer et al., 1997). Es wurde eine Störung des *cotranslational assembly* vermutet, indem die möglicherweise fehlerhaft gefaltete mRNA ihre eigene Translation verhindert. Der Mechanismus des *cotranslational assembly* wird auch für MHC angenommen (Isaacs and Fulton, 1987). Eine mutierte β -MHC mRNA könnte also ebenfalls ihre eigene Translation behindern, so dass es zu einer verringerten Menge an mutiertem Protein kommen könnte.

Neben der Störung des *cotranslational assembly* durch die mutierte mRNA könnten auch die direkt am Einbauort synthetisierten, mutierten Proteine ein Aggregieren erschweren. Während des Einbaus ins Filament wäre, selbst bei intaktem Schwanzteil, eine hinderliche

Wechselwirkung des Kopfes mit benachbarten Proteinen denkbar. Zusätzlich wurde beobachtet, dass im sich entwickelnden Muskel nicht ins Filament eingebautes mutiertes Protein durch den Proteasomen-Komplex rasch proteolysiert wurde (Fyrberg et al., 1990; Tanaka et al., 1992). Dieser Vorgang könnte ebenfalls eine verringerte Menge an mutiertem Myosin erklären.

Die Proteine in einem Filament haben eine bestimmte Halbwertszeit. Es wäre also denkbar, dass der Auf- und Abbau der mutierten Proteine im Filament verändert ist. Der niedrige ermittelte Wert könnte das Ergebnis einer erhöhten Abbaurate eines ursprünglich höheren Gehaltes an Mutante sein. Die andere Möglichkeit wäre eine verlangsamte Abbaurate eines ursprünglich geringeren Anteils an mutiertem Protein, so dass dieses im Filament akkumuliert. Ein analoger Abbaumechanismus wurde bei Phenylketonurie gefunden, einer Krankheit, die wie FHC durch Missense-Mutationen hervorgerufen wird. Bei Phenylketonurie wurden ebenfalls verringerte Mengen an mutiertem Protein festgestellt, die durch einen erhöhten *turnover* des mutierten Proteins entstehen. Die intrazellulären Proteasen des Proteinqualitäts-Kontrollmechanismus degradieren das mutierte Protein stärker als das wildtyp Protein (Gegersen et al., 2000).

6.5 Mögliche Mechanismen, die zu den Abweichungen während der Genexpression führen bei den Patienten H 2 (Gly 584 → Arg), H 5 (Val 606 → Met) und H 13 (Arg 719 → Trp)

Die Abweichung vom 1:1 Verhältnis der DNA-Anlage von Wildtyp und Mutante des Patienten H 5 mit der Val 606 → Met war bereits auf mRNA-Ebene messbar. Innerhalb der Fehlergrenzen kann angenommen werden, dass gleich viel mRNA und Protein vorhanden sind. Da die gemessenen Anteile von mRNA und Protein signifikant unter 50 Prozent liegen, muss der Gehalt von 28 Prozent Mutante bereits auf Transkriptionsebene entstehen.

Der Anteil messbarer mRNA entsteht aus einem Fließgleichgewicht von Bildung und Degradation der mRNA. Da die bekannten Transkriptions-Kontrollmechanismen nicht von Punktmutationen im kodierenden Bereich des Gens beeinflusst werden, sollte die Abweichung eher durch die beschleunigte Degradation der mutierten β -MHC mRNA entstehen.

Eine zweite Möglichkeit der Interpretation der Gehalte an mutierter mRNA und mutiertem Myosin wäre, eine beschleunigte Degradation von sowohl mRNA als auch Protein

anzunehmen. Wenn die mutierte mRNA nicht schnell genug degradiert werden konnte, könnte noch ein Teil, die ermittelten 28 Prozent, in Protein translatiert werden. Der Gehalt an mutiertem Protein kann durch die Synthese- oder Abbaurate des mutierten Proteins oder durch die Inkorporationsmechanismen des Filaments, zum Beispiel beim *cotranslational assembly* bestimmt werden. Auf die Translationsrate haben die hier beschriebenen Mutationen im kodierenden Bereich der mRNA sehr wahrscheinlich keinen Einfluss. Ein Proteinqualitäts-Kontrollmechanismus, der das mutierte Myosin erkennt und degradiert, ist sehr gut vorstellbar. Dies wird vor allem von der Tatsache unterstützt, dass dieses Phänomen bereits bei mindestens drei Krankheiten beschrieben wurde, die ebenfalls durch Punktmutationen entstehen (Gregersen et al., 2000). Für jede dieser Krankheiten wurde ein separater Mechanismus beschrieben, so dass für FHC ein ähnlicher oder bisher unbekannter Proteinqualitäts-Kontrollmechanismus angenommen werden kann. Die Degradation des Proteins würde dann zu einem Anteil von 12 Prozent Myosin mit der Val 606 → Met Mutation führen, mit dem der Körper unbeschadet leben kann, worauf die fehlende klinische Symptomatik des Patienten H 5 hindeutete.

Die Ergebnisse des Patienten H 13 (Arg 719 → Trp Mutation) lassen die Spekulation zu, dass die Abweichung vom 1:1 Verhältnis auf Translationsebene oder auf Transkriptionsebene entstehen kann. Aufgrund der Fehlergrenzen ist aber eher anzunehmen, dass der Gehalt an mutierter mRNA und Protein gleich ist. Der Gehalt an mutierter Spezies könnte entweder unter oder bei 50 Prozent liegen, wobei diese Abschätzung anhand der Überschneidung der Fehlergrenzen der Messwerte von mRNA- und Proteingehalt getroffen wurden. Diese Werte lassen dann die Interpretation zu, dass entweder die mutierte mRNA oder das mutierte Protein genauso stabil wie wildtyp mRNA oder Protein sind, bzw. stabiler als die mutierte mRNA oder das mutierte Protein des Patienten mit der Val 606 → Met Mutation. Der hohe Gehalt an mutierter mRNA und Protein, könnten darauf hindeuten, dass die beim Patienten H 5 (Val 606 → Met) angenommene Degradation der mutierten mRNA uneffektiver war und diese ungehindert in Protein translatiert wurde. Die zweite Interpretationsmöglichkeit wäre, dass die Arg 719 → Trp Mutation nach einem anderen Mechanismus als die Val 606 → Met Mutation wirkt: Beide Allele werden in gleichem Maße in mRNA transkribiert und das, relativ zum Protein mit der Val 606 → Met Mutation stabilere, Protein kann nicht degradiert werden.

Dass der Körper prinzipiell bestrebt sein könnte, die mutierte Spezies zu degradieren, deuten die hier vorgestellten Ergebnisse an, bei denen unterschiedliche Gehalte an mutierter mRNA und Protein gefunden wurden und nicht beides im 1:1 Verhältnis vorlag. Da die Art der Mutation und der Gehalt an mutiertem Protein wahrscheinlich mit dem Schweregrad der Krankheit korrelieren (siehe Abbildung 6.2), könnte der Fall des Patienten H 13 (Arg 719 → Trp) mit besonders bösartigem Phänotyp und dem höchsten Anteil an mutierter mRNA und mutiertem Myosin den Fall des höchsten Versagens möglicher Kontrollmechanismen mit anschließender Degradation darstellen.

Auf welcher Stufe der Genexpression die 20 Prozent mutiertes Myosin des Patienten H 2 (Gly 584 → Arg) entstehen, bleibt leider unklar, da der Gehalt an mutierter mRNA nicht ermittelt werden konnte, weil kein natives Biopsiematerial vorhanden war. Aus diesem Grund könnten beide der oben beschriebenen Situationen vorliegen: eine Abweichung auf Transkriptions- oder auf Translationsebene.

Bisher wurde nur die *down*-Regulation der mutierten Spezies diskutiert. Dabei bleibt unklar, ob das gesunde Allel seine Expressionsrate beibehält oder kompensatorisch wirksam werden kann, um die Gesamtmenge an Myosin konstant zu halten. Auf eine veränderte oder zerstörte Sarkomerenstruktur, wie sie durch eine gestörte Stöchiometrie von Aktin und Myosin entstehen kann (Beall et al., 1989; Jones et al., 1996), deutete die mikroskopische Untersuchung von Muskelfasern der hier beschriebenen Patienten nicht hin. Ebenfalls konnte kein verändertes Myosin-Aktin-Verhältnis beobachtet werden, so dass das gesunde Allel höchstwahrscheinlich genügend Myosin exprimieren kann, um die Gesamtmenge aufrechtzuerhalten.

Auffällig an den ermittelten mRNA-Gehalten ist, dass verschiedene Missense-Mutationen verschiedene Mengen an mutierter mRNA und Protein verursachen. Dies könnte bedeuten, dass die Mutationen die Stabilität der mRNAs und der Proteine unterschiedlich stark beeinflussen. Die mRNA des Patienten mit der Arg 719 → Trp Mutation müsste also praktisch normal stabil sein, während die mRNA des Patienten mit der Val 606 → Met Mutation leichter abgebaut wird.

Der gemessene Gehalt an mutierter mRNA und mutiertem Protein zeigt dann wahrscheinlich die Fähigkeit eines Kontrollsystems, die unerwünschte Spezies zu degradieren. Dies deckt sich mit den bisher bekannten Mechanismen der Transkription, die sehr wahrscheinlich nicht durch Punktmutationen im kodierenden Bereich eines Gens

hervorgerufen werden. Das wildtyp und mutierte Allel würden dann beide zu gleichen Teilen in mRNA transkribiert.

6.6 Bedeutung der Ergebnisse für Erklärungsversuche zur Variabilität von FHC

Nachdem die verschiedenen Möglichkeiten diskutiert wurden, wie die Abweichung des mRNA- und Filamentprotein-Verhältnisses von den erwarteten 50 zu 50 Prozent für Wildtyp und Mutante entstehen könnte, soll jetzt die Konsequenz dieser Beobachtung auf das Krankheitsbild der FHC erörtert werden.

6.6.1 Hypothese der Arbeit

Wenn man Gehalte an mutierter mRNA und mutiertem Myosin im Filament (Abbildung 6.2) als phänotypische Ausprägung von FHC einzelner Patienten betrachtet, fällt auf, dass der Anteil mutierter Spezies mit dem Schweregrad der Krankheit der betroffenen Patienten korreliert.

Patient, Mutation	DNA-Ebene	mRNA-Ebene	Filamentebene	Schweregrad der Krankheit
H 5, Val 606 → Met	50 %	28 %	12 %	leicht/nicht betroffen
H 2, Gly 584 → Arg	50 %	--	20 %	leicht/nicht betroffen
H 13, Arg 719 → Trp	50 %	57 %	40 %	schwer betroffen

Abbildung 6.2 Gehalt an mutierter Spezies und Schweregrad von FHC.

Bei dem schwer betroffenen Patient H 13 wurde ein höherer Gehalt an mutierter β -MHC als bei den gering betroffenen Patienten H 5 und H 2 gefunden. Die Abweichung vom 50 Prozent Gehalt auf DNA-Ebene kann bereits auf mRNA-Ebene, oder möglicherweise auch auf Filamentebene erfolgen (siehe Patient H 5 mit der Val 606 → Met Mutation).

Der Patient H 5 mit der Val 606 → Met Mutation war nahezu symptomfrei. Er wurde auf die Mutation hin untersucht, da es in seiner Familie an FHC erkrankte Mitglieder gab. Ebenso war der Patient mit der Gly 584 → Arg Mutation klinisch unauffällig. Dagegen zeigte der Patient mit der Arg 719 → Trp Mutation massive Symptome von FHC.

Zusätzlich zu der Art der Mutation könnte mit den unterschiedlichen Mengen an mutierter mRNA und mutiertem Protein möglicherweise das heterogene Krankheitsbild der FHC erklärt werden. Besonders wenn Familien mit der gleichen Mutation und Mitglieder der gleichen Familie einen stark unterschiedlichen Krankheitsverlauf zeigen, könnte die Ursache der unterschiedlich hohe Anteil an mutiertem Myosin im Gewebe sein. Dieser Gehalt an mutiertem Myosin könnte bei solchen Gruppen der Faktor sein, der eine verallgemeinernde Aussage zum Schweregrad von FHC erlaubt, da er bei jedem Patienten individuell sein könnte.

Dies steht in direktem Einklang mit den beiden für FHC diskutierten Mechanismen, wie eine Myosinmutation ihre Wirkung ausübt. Die Mutation könnte dann entweder als *poison polypeptide* oder auch über einen Haploinsuffizienz-ähnlichen Mechanismus wirken (siehe Einleitung in den Abschnitten 2.2.3 und 2.2.5), wobei die Krankheit, je nach Art der Mutation, mit steigendem Gehalt an mutiertem Protein einen maligner werdenden Phänotyp zeigen würde. In dem einen Fall wäre mehr *poison polypeptide* vorhanden, welches die Funktion des Sarkomers beeinträchtigen könnte. Im dem anderen Fall würde die Stöchiometrie bzw. die Filamentstruktur um so stärker beeinträchtigt, je mehr mutiertes Protein vorhanden wäre, was gleichfalls zu einer verschlechterten Sarkomerenfunktion führen könnte.

Hinweise auf die Schwere eines Krankheitsverlaufs, der mit zunehmender Menge mutierten Myosins schlimmer wird, zeigten auch Vergleiche von homozygoten mit heterozygoten Patienten mit der gleichen Mutation. In einer FHC-Familie mit einer Mutation im Codon 935 waren die heterozygoten Eltern und ihre Tochter ohne Krankheitssymptome, wogegen die beiden homozygoten Söhne im Alter von 30 und 32 Jahren verstarben. Hierfür wurde ein sogenannter Gendosis-Effekt verantwortlich gemacht, nach dem angenommen wird, dass zwei mutierte Allele sich negativer auswirken als eins. Wahrscheinlich konnten die homozygoten Patienten ausschließlich mutiertes Myosin bilden (Nishi et al., 1994). Ein vergleichbares Resultat zeigten Untersuchungen des Arg 403 → Gln Mausmodells. Während die heterozygoten Mäuse, von denen angenommen wurde, dass sie 50 Prozent mutiertes Protein exprimierten, lebensfähig waren, starben die

homozygoten Mäuse, mit höchstwahrscheinlich 100 Prozent mutiertem Protein, innerhalb weniger Tage nach der Geburt (Fatkin et al., 1999; Geisterfer-Lowrance et al., 1996).

Die einzige weitere Untersuchung eines Gehalts an mutiertem Myosin bei FHC-Patienten, mit einer Arg 403 → Gln Mutation, ergab einen mittleren Wert von ungefähr 50 Prozent mutiertem Protein. Daraufhin wurde die äquimolare Expression beider Allele angenommen. Bei der Ermittlung des Gehaltes wurden Messwerte verschiedener Patienten gepoolt, so dass ein Mittelwert an mutiertem Myosin erhalten wurde. Eine Korrelation des Schweregrades der Krankheit einzelner Patienten mit ihrem Gehalt an mutiertem Myosin war somit nicht möglich. Der Mittelwert von ungefähr 50 Prozent mutiertem Myosin ergab sich aus Werten von 24 Prozent bis 65 Prozent. Es wäre also denkbar, dass die verschiedenen Anteile an Mutante von unterschiedlich stark betroffenen Patienten stammen. Wie es den untersuchten Patienten gesundheitlich im Einzelnen ging und wie ihr individueller Gehalt an Mutante war, ist den veröffentlichten Daten nicht zu entnehmen (Malinchik et al., 1997). Es wäre also denkbar, dass diese Ergebnisse auch auf andere Weise interpretiert werden könnten: In verschiedenen Patienten mit der gleichen Mutation wurden unterschiedliche Mengen an mutiertem Myosin exprimiert, wobei die Menge möglicherweise noch mit der unterschiedlichen Ausprägung des Phänotyps korreliert.

Gerade die vergeblichen Versuche einen allgemeingültigen Zusammenhang zwischen der Schwere des Krankheitsbildes und dem Ausmaß an Hypertrophie herzustellen oder auch die Art der Mutation alleine mit der Sterblichkeit korrelieren zu wollen, zeigen, dass jeder Patient individuell betrachtet werden sollte (siehe Kapitel 2.4).

In einem weiteren Mausmodell wurde neben der Arg 403 → Gln Mutation eine Deletion eingeführt. Die resultierenden Mauslinien zeigten trotz gleicher Erbanlagen einen unterschiedlichen Gehalt von 25 bis 50 Prozent an mutiertem Transkript, welches zu unterschiedlichen Mengen an mutiertem Protein von 1 bis 12 Prozent führte. Die vermehrte Expression des mutierten Proteins führte bei den Mäusen zu einem schwereren FHC-Phänotyp (Vikstrom et al., 1996). Trotzdem hier ein Tiermodell mit einer Missense- und einer Deletions-Mutation untersucht wurde, spiegeln die Ergebnisse die in dieser Arbeit beobachtete Korrelation zwischen Gehalt an mutiertem Myosin und Schweregrad des FHC-Phänotyps wider.

Die Überlegung, dass der Anteil an mutiertem Protein für den Schweregrad des Phänotyps einer Krankheit mit verantwortlich sein könnte, wurde bereits am Beispiel des Wiscott-

Aldrich Syndroms (WAS) gezeigt. WAS ist eine X-chromosomal rezessiv vererbte Immunschwäche, die durch Mutationen im WAS-Protein (WASP) Gen verursacht wird. Es sind Missense-, Nonsense-, Frameshift-, und Spleißstellen-Mutationen gefunden worden. Ebenso wie bei FHC, verursachen die Mutationen bei WAS ein weites Spektrum an Phänotypen. Allerdings korreliert der Schweregrad von WAS wahrscheinlich mit der Abwesenheit des Proteins. Patienten, die ein normalgroßes, wenn auch mutiertes Protein besaßen, zeigten einen milderen Phänotyp als Patienten ohne Protein. Die Schlussfolgerung der Studie war, dass eine DNA-Analyse für eine Vorhersage eines Krankheitsverlaufs nicht ausreichend ist. Es sind ebenso Untersuchungen der Transkript- und Proteinebene für eine Einschätzung notwendig (Lemahieu et al., 1999).

6.6.2 Einfluss genetischer und umweltbedingter Faktoren auf FHC

Der Einfluss genetischer und umweltbedingter Faktoren wurde bisher als eine der wenigen Erklärung für die Heterogenität von FHC diskutiert. Dabei sollen vor allem die Lebensbedingungen, Alter, zusätzliche Erkrankungen oder der Ernährungszustand eine Rolle spielen (Kelly and Strauss, 1994). Systematische und vergleichende Untersuchungen über den Einfluss von Umweltfaktoren oder den jeweiligen allgemeinen Gesundheitszustand von Patienten und die Schwere der FHC gibt es jedoch nicht.

Es gibt Versuche, Gene zu finden, die modifizierend auf die phänotypische Expression von FHC wirken könnten. Das einzig signifikante Ergebnis erbrachten Untersuchungen des Angiotensin-I-konvertierenden-Enzyms (ACE). ACE Insertions-/Deletions (I/D) Polymorphismen wurden in Patienten mit HCM gefunden. Dabei tritt das veränderte D-Allel häufiger in Patienten mit HCM und plötzlichem Herztod auf, als in der Kontrollbevölkerung. Dieser Zusammenhang konnte allerdings nur für Codon 403 des β -MHC Gens festgestellt werden und nicht für Mutationen im Myosin-Bindenden-Protein-C Gen. Daraus wurde geschlossen, dass es multiple genetische Modifizierungen für die verschiedenen Mutationen geben müsse (Marian et al., 1993; Tesson et al., 1997; Yoneya et al., 1995).

Im Gegensatz dazu zeigen Studien an identischen Zwillingen, die genetisch homogen sind, dass neben den genetischen Faktoren noch andere Faktoren auf die Ausprägung des FHC-Phänotyps eine Rolle spielen müssen. Die Zwillinge mit dem gleichen genetischen Hintergrund zeigten in ihrer Herzmorphologie einen unterschiedlichen Schweregrad von Hypertropher Kardiomyopathie (Ko et al., 1992).

Diese Beispiele zeigen, dass die Heterogenität von FHC nicht ausschließlich durch zusätzliche, modifizierend wirkende Mutationen oder mit dem Vorhandensein verschiedener genetischer Hintergründe der Patienten erklärt werden kann. Allerdings zeigt das Beispiel der Zwillinge auch, dass bei gleichem genetischen Hintergrund die Lebensbedingungen, der Ernährungszustand oder der gesundheitliche Allgemeinzustand eines Patienten sicherlich Einfluss auf die Ausprägung des FHC-Phänotyps haben müssen. Dabei könnten auch die gleichen genetische Anlagen durch unterschiedliche Lebensbedingungen zu unterschiedlicher Ausprägung kommen. Gerade innerhalb einer Familie oder bei Familien mit der gleichen Mutation müssten diese Umweltfaktoren oder genetischen Anlagen, auf noch unbekannte Weise, die möglicherweise unterschiedlichen Anteile von mutierter an Gesamt- β -MHC mRNA oder Protein verursachen.

6.6.3 Fazit

Wir konnten zeigen, dass die Abweichung von der 1:1 Anlage von wildtyp und mutiertem Allel auf DNA-Ebene, bereits auf mRNA-Ebene existiert und möglicherweise zusätzlich auf Proteinebene auftreten kann. Die hier dargestellten Ergebnisse stellen individuelle Phänotypen dreier Patienten dar, da die Heterogenität der Krankheit verlangt, jede Mutation einzeln zu betrachten. Aufgrund unserer Beobachtungen könnte ein korrelierender Faktor für den Schweregrad der Krankheit die Menge an eingebautem mutiertem Myosin sein. Eine ähnliche Beobachtung wurde bereits in der Literatur beschrieben. Außerdem steht diese Erklärung der Variabilität direkt im Einklang mit den für FHC postulierten Entstehungsmechanismen. Für die Modifizierung des Phänotyps müssen neben den genetischen noch andere Faktoren eine Rolle spielen. Es wäre vorstellbar, dass die Lebensbedingungen und der Gesundheitszustand eines Patienten, sowie die verschiedene Ausprägung bei zwei Patienten gleicher genetischer Anlagen zur Heterogenität der Krankheit entscheidend beitragen, besonders zur Heterogenität von Patienten mit gleicher Mutation.

7 Ausblick

7.1 Mögliche Versuche zur Erforschung der Ursachen von FHC

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die Abweichung der 1:1 Anlage von wildtyp und mutiertem Allel bereits auf der Transkriptions- und möglicherweise auch auf der Translationsebene erfolgen kann, sind jetzt die Voraussetzungen gegeben von weiteren FHC-Patienten Biopsiematerial sowohl auf mRNA- als auch Proteinebene zu untersuchen.

Der erste Ansatz, um die Hypothese zu untermauern, dass bei gleicher Mutation der korrelierende Faktor zum Schweregrad der FHC die Menge an mutiertem Myosin ist, wäre die Untersuchung von Patienten einer Familie, die die gleiche Mutation besitzen, aber unterschiedliche Phänotypen zeigen. Es sollten jedesmal sowohl das Verhältnis von wildtyp und mutiertem Myosin, als auch das mRNA-Verhältnis ermittelt werden. Die Protein- und mRNA-Verhältnisse könnten dann klären, ob bei allen Patienten die Abweichung vom 1:1 Verhältnis der Allele auf DNA-Ebene bereits auf mRNA-Ebene erfolgt, wie hier bei dem Patienten H 5 (Val 606 → Met), oder ob es auch Patienten mit Mutationen gibt, bei denen die Abweichung erst auf Proteinebene entsteht, wie möglicherweise bei dem Patienten H 13 (Arg 719 → Trp).

Aus den Messwerten dieser Arbeit ist ersichtlich, dass eine Mutation in der β -MHC zu einer verringerten Menge an mutierter mRNA führen kann. Es wurde diskutiert, dass die Mutation wahrscheinlich die Stabilität der mRNA beeinflusst. Um diese These zu verifizieren, müsste die Stabilität von wildtyp und mutierter mRNA verglichen werden. Dafür müsste zuerst wildtyp und mutierte mRNA gewonnen werden. Da die FHC-Patienten zum überwiegenden Teil heterozygote Träger der Mutation sind, ergibt eine Isolierung von mRNA aus deren Gewebe stets eine Mischung von mutierter und wildtyp mRNA. Es könnten ebenfalls die mRNA von Wildtyp-Kontrollen und homozygoten FHC-Trägern verglichen werden. Es wurde allerdings nur von zwei homozygoten Mutationen berichtet, wovon die Träger der einen Mutation bereits verstorben sind. Eine einfachere Möglichkeit, mit der auch jede beliebige Mutation überprüft werden könnte, wäre das Etablieren eines *in vitro* Transkriptionsvektorsystems in Zellkultur. Zuerst müssten die wildtyp und mutierten β -MHC mRNA Konstrukte in diese Expressionsvektoren kloniert werden, mit denen dann, nach Zugabe von RNA-Polymerase und Ribonukleosidtriphosphaten, mRNA exprimiert werden kann. Die Zellen müssten dann die mRNA auf

die für Eukaryonten typische Weise prozessieren. Danach müsste ein Test entwickelt werden, um die Stabilität der mRNA zu überprüfen bzw. deren Halbwertszeit zu bestimmen. Dies könnte an radioaktiv markierter oder Fluoreszenz-markierter mRNA geschehen. Radioaktiv markierte mRNA kann zum Beispiel durch Inkubation von radioaktiv markiertem UTP und nicht-markierten Ribonucleotiden und isolierten Zellkernen erhalten werden. Vielleicht könnte man auch den Zerfall fluoreszierender mRNA-Moleküle in einem Zellkultursystem beobachten. Parallel zu einem Zellsystem, wäre auch eine Untersuchung am Tiermodell vorstellbar (siehe Kapitel 7.2).

Des Weiteren wäre es interessant, die mRNA und Proteinverhältnisse auch an Herzbiopsien der Patienten zu bestimmen, um zu überprüfen, ob sich die Beobachtungen im *musculus soleus* mit denen im Herzen decken. Ein Vergleich der Sarkomerenstruktur und Histologie könnte zeigen, ob die Mutationen im dauerbelasteten Herzmuskel eine stärkere Fehlordnung oder histopathologische Merkmale bewirken als im *musculus soleus*. Allerdings ist es nicht sehr wahrscheinlich, dass Patienten sich zu diesem Zweck Herzmuskelbiopsien entnehmen lassen.

Um mehr Hinweise zu erhalten, nach welchen Mechanismen der Körper die mutierte mRNA oder möglicherweise auch das Protein degradiert, wäre es interessant die in dieser Arbeit beschriebenen Analysemethoden auf Muskel-Einzelfasern anzuwenden. Die Beobachtung, dass der schwer erkrankte Patient H 13 (Arg 719 → Trp) dünnere langsame Fasern als eine Kontrollperson hat (Kommunikation PD Dr. T. Kraft), könnte auf einen stark aktiven Degradationsvorgang hinweisen. In diesem Zusammenhang wäre es interessant, bei verschiedenen Patienten zu untersuchen, ob einzelne Fasern nur aus mutiertem, nur aus wildtyp oder aus Mischungen beider Proteine bestehen. Daraus könnte man dann u.U. schließen, welche und ob Fasern bevorzugt degradiert werden.

7.2 Mögliche Versuche mit Tiermodellen

Wenn die Abweichung der mRNA-Expression von den erwarteten 50 Prozent bei der Val 606 → Met ein Merkmal von FHC ist, sollte sich ein abweichender Wert auch im analogen Tiermodell erzeugen lassen. Vielleicht könnten durch verschiedene Umweltfaktoren (Stress, Diät, Sport etc.) die Lebensbedingungen der Mäuse derart verändert werden, dass es zur Ausprägung unterschiedlicher Phänotypen und Expressionswerte der mutierten β -MHC mRNA kommt. Dies kann dann als Beleg der Hypothese gedeutet werden, dass die Variabilität von FHC neben der Art der Mutation

auch mit dem Gehalt der mutierten mRNA bzw. des mutierten Proteins korreliert. Darüber hinaus könnte in dieser Versuchssituation untersucht werden, wie es mechanistisch auf molekularer Ebene zu den möglicherweise veränderten mRNA-Stabilitäten kommen kann. Zunächst würde sich ein Vergleich von wildtyp mit mutierter mRNA anbieten. Am eindrucksvollsten wäre der Vergleich von zwei Mutationen, wenn als Modell vorhanden, die zu unterschiedlichen Mengen mutierter mRNA führen würden.

Eine weitere interessante Fragestellung ist, ob der Anteil an mutiertem Myosin während des ganzen Lebens konstant bleibt oder ob es eine altersabhängige Zu- oder Abnahme gibt. Diese Frage stellt sich aufgrund der verschiedenen Lebenserwartungen, die mit einigen Mutationen verknüpft zu sein scheinen. Es ist allerdings fraglich, ob sich ein Patient in regelmäßigen Abständen Biopsien entnehmen lässt. Diese Fragestellung wäre daher ideal für die Übertragung auf ein Tiermodell.

Auch die in dieser Arbeit diskutierte Frage, wie hoch der Gehalt an mutierter mRNA und mutiertem Myosin bei Mitgliedern der gleichen Familie ist, könnte im Tiermodell simuliert werden, ebenso wie die Frage, wie hoch dieser Anteil bei verschiedenen Familien mit der gleichen Mutation ist. Zur Beantwortung der ersten Frage müssten die Mitglieder einer Mausfamilie untersucht werden. Zur Beantwortung der zweiten Fragestellung müsste die gleiche Mutation in zwei verschiedene Familien einer Mauslinie eingeführt werden, die anschließend analysiert werden müssten. Dieser Versuchsansatz wäre dann sinnvoll, wenn sich keine geeigneten Patientenfamilien finden.

Im Tiermodell könnte weiterhin die, auf den Phänotyp modifizierende, Wirkung von genetischem Hintergrund und von Umweltfaktoren untersucht werden. Dafür könnten Nachkommen der mutierten Mauslinie mit Nachkommen der mutierten Mauslinie, die mit einer anderen Mauslinie gekreuzt wurde, verglichen werden. Die Auswirkung eines anderen genetischen Hintergrundes könnte dann am möglicherweise veränderten Phänotyp beurteilt werden. Sollten andere Mutationen modifizierend auf den Phänotyp wirken, könnten auch für diese Untersuchungen Mauslinien mit der gewünschten zweiten Mutation erzeugt und mit den FHC-Mäusen gekreuzt werden

Mäuse bieten sich aufgrund der einfachen Haltung, Manipulierbarkeit der DNA und schnellen Reproduktionsrate als Versuchstiere an. Allerdings wurde bis jetzt noch kein Mausmodell beschrieben, das den beim Menschen beobachteten Phänotyp exakt widerspiegelt. Abgesehen vom Unterschied der Spezies liegt dies wahrscheinlich daran,

dass fast alle Mutationen in die α -MHC der Maus integriert wurden, während die beim Menschen überwiegende Isoform im Herzen die β -MHC ist. Da die Expression der β -Isoform Schilddrüsenhormon-gesteuert ist, könnte es möglich sein, durch Hypothyriose bei Mäusen die Expression der β -Isoform zu induzieren (Gustafson et al., 1985).

7.3 Mögliche Therapieansätze

Eine Frage, die sich aus dieser Arbeit ergibt ist, ob die neuen Erkenntnisse Ansätze für neue Therapiemöglichkeiten bieten. Ein möglicher, vollkommen neuer Therapieansatz sollte die beobachteten Anteile von mutierter mRNA und mutiertem Protein an der Gesamtmenge der β -MHC mRNA und Protein nutzen: Wenn es sich generell bewahrheitet, dass ein gutartiger FHC-Phänotyp mit wenig mutierter Spezies und ein bösartigerer mit mehr mutierter Spezies einhergeht, könnte versucht werden den Anteil an mutierter mRNA bzw. mutiertem Protein zu reduzieren. Dass der Körper prinzipiell mit einer relativ geringen Menge mutiertem Protein (12 Prozent) gut funktionieren kann und das wildtyp Allel wahrscheinlich dementsprechend seine Expressionsrate (auf 88 Prozent) steigern kann, zeigt der gutartige Phänotyp des Patienten H 5 mit der Val 606 \rightarrow Met Mutation. Möglicherweise ließe sich der Anteil mutierten Proteins bei einem stark erkrankten Patienten mit der gleichen Mutation auf dieses Niveau oder sogar noch darunter reduzieren. Für einen derartigen Therapieansatz müsste natürlich erst gezeigt werden, dass es bei ein und derselben Mutation zu unterschiedlichen Mengen von mutierter mRNA oder mutiertem Protein kommen kann, die dann jeweils mit unterschiedlichen klinischen Phänotypen assoziiert sind. Zweitens wäre erforderlich, den Mechanismus zu kennen, wie es trotz gleicher Mutation zu solchen Unterschieden in mutierter RNA- oder Proteinmenge kommen kann.

Der grundlegende Ansatz zur Therapie von Krankheiten, die durch dominant negative Effekte hervorgerufen werden, ist eine Blockierung der Genexpression auf DNA-, mRNA- oder Proteinebene. Eine weitere Möglichkeit ist die Korrektur der bestehenden Mutation, was praktisch aber noch mit großen Schwierigkeiten verbunden ist (Strachan and Read, 1996).

Die Behandlung von FHC durch gentherapeutische Korrektur der Mutation wäre natürlich grundsätzlich wünschenswert und die eigentliche Kausaltherapie. Allerdings ist gerade bei dominanten Erbkrankheiten, die durch Punktmutationen in einem Allel hervorgerufen

werden, dieser Ansatz nicht vielversprechend und noch nicht in der klinischen Anwendung (Strachan and Read, 1996). Daher ist es besonders wichtig, die Mechanismen zu erforschen, wie es durch die β -MHC-Mutationen zu den Abweichungen der 1:1 Anlage von wildtyp und mutiertem Allel kommen kann, um dort möglicherweise therapeutisch eingreifen zu können.

8 Literaturverzeichnis

Abchee, A., and Marian, A. J. (1997). Prognostic significance of beta-myosin heavy chain mutations is reflective of their hypertrophic expressivity in patients with hypertrophic cardiomyopathy, *J Investig Med* 45, 191-6.

al-Mahdawi, S., Chamberlain, S., Cleland, J., Nihoyannopoulos, P., Gilligan, D., French, J., Choudhury, L., Williamson, R., and Oakley, C. (1993). Identification of a mutation in the beta cardiac myosin heavy chain gene in a family with hypertrophic cardiomyopathy, *Br Heart J* 69, 136-41.

Anan, R., Greve, G., Thierfelder, L., Watkins, H., McKenna, W. J., Solomon, S., Vecchio, C., Shono, H., Nakao, S., Tanaka, H., Mares, A., Towbin, J. A., Spirito, P., Roberts, R., Seidman, J. G., and Seidman, C. E. (1994). Prognostic implications of novel beta cardiac myosin heavy chain gene mutations that cause familial hypertrophic cardiomyopathy [see comments], *J Clin Invest* 93, 280-5.

Arai, S., Matsuoka, R., Hirayama, K., Sakurai, H., Tamura, M., Ozawa, T., Kimura, M., Imamura, S., Furutani, Y., Joh-o, K., Kawana, M., Takao, A., Hosada, S., and Momma, K. (1995). Missense mutation of the beta-cardiac myosin heavy-chain gene in hypertrophic cardiomyopathy, *Am J Med Genet* 58, 267-76.

Beall, C. J., Sepanski, M. A., and Fyrberg, E. A. (1989). Genetic dissection of *Drosophila* myofibril formation: effects of actin and myosin heavy chain null alleles, *Genes Dev* 3, 131-40.

Becker, K. D., Gottshall, K. R., Hickey, R., Perriard, J. C., and Chien, K. R. (1997). Point mutations in human beta cardiac myosin heavy chain have differential effects on sarcomeric structure and assembly: an ATP binding site change disrupts both thick and thin filaments, whereas hypertrophic cardiomyopathy mutations display normal assembly, *J Cell Biol* 137, 131-40.

Bejsovec, A., and Anderson, P. (1990). Functions of the myosin ATP and actin binding sites are required for *C. elegans* thick filament assembly, *Cell* 60, 133-40.

Bonne, G., Carrier, L., Bercovici, J., Cruaud, C., Richard, P., Hainque, B., Gautel, M., Labeit, S., James, M., Beckmann, J., and et al. (1995). Cardiac myosin binding protein-C

gene splice acceptor site mutation is associated with familial hypertrophic cardiomyopathy, *Nat Genet* 11, 438-40.

Bonne, G., Carrier, L., Richard, P., Hainque, B., and Schwartz, K. (1998). Familial hypertrophic cardiomyopathy: from mutations to functional defects, *Circ Res* 83, 580-93.

Brenner, B. (1983). Technique for stabilizing the striation pattern in maximally calcium-activated skinned rabbit psoas fibers, *Biophys J* 41, 99-102.

Brown, E. J., and Schreiber, S. L. (1996). A signaling pathway to translational control, *Cell* 86, 517-20.

Byers, P. H. (1990). Brittle bones--fragile molecules: disorders of collagen gene structure and expression, *Trends Genet* 6, 293-300.

Chomczynski, P., and Sacchi, N. (1986). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction, *Anal Biochem* 162, 156-159.

Choong, C. S., Quigley, C. A., French, F. S., and Wilson, E. M. (1996). A novel missense mutation in the amino-terminal domain of the human androgen receptor gene in a family with partial androgen insensitivity syndrome causes reduced efficiency of protein translation, *J Clin Invest* 98, 1423-31.

Cuda, G., Fananapazir, L., Zhu, W. S., Sellers, J. R., and Epstein, N. D. (1993). Skeletal muscle expression and abnormal function of beta-myosin in hypertrophic cardiomyopathy, *J Clin Invest* 91, 2861-5.

Dole, M., Mack, L. L., Hines, R. L., Mobley, R. C., Ferguson, L. D., and Alice, M. B. (1968). Molecular beams of macroions., *J Chem Phys* 49, 2240-2249.

Eckerskorn, C. (1998). Massenspektrometrie. In *Bionalytik*, F. Lottspeich, and H. Zorbas, eds. (Heidelberg, Berlin, Spektrum Akademischer Verlag), pp. 323-368.

Epstein, N. D., Cohn, G. M., Cyran, F., and Fananapazir, L. (1992). Differences in clinical expression of hypertrophic cardiomyopathy associated with two distinct mutations in the beta-myosin heavy chain gene. A 908Leu----Val mutation and a 403Arg----Gln mutation [see comments], *Circulation* 86, 345-52.

Fananapazir, L., and Epstein, N. D. (1994). Genotype-phenotype correlations in hypertrophic cardiomyopathy. Insights provided by comparisons of kindreds with distinct

and identical beta-myosin heavy chain gene mutations [see comments], *Circulation* 89, 22-32.

Fatkin, D., Christe, M. E., Aristizabal, O., McConnell, B. K., Srinivasan, S., Schoen, F. J., Seidman, C. E., Turnbull, D. H., and Seidman, J. G. (1999). Neonatal cardiomyopathy in mice homozygous for the Arg403Gln mutation in the alpha cardiac myosin heavy chain gene, *J Clin Invest* 103, 147-53.

Fenn, J. B. (1993). Ion formation from charged droplets: roles of geometry, energy, and time., *J Am Soc Mass Spectrom* 4, 524-535.

Fisher, E., and Scambler, P. (1994). Human haploinsufficiency--one for sorrow, two for joy, *Nat Genet* 7, 5-7.

Fulton, A. B., and L'Ecuyer, T. (1993). Cotranslational assembly of some cytoskeletal proteins: implications and prospects, *J Cell Sci* 105, 867-71.

Fyrberg, E., Fyrberg, C. C., Beall, C., and Saville, D. L. (1990). *Drosophila melanogaster* troponin-T mutations engender three distinct syndromes of myofibrillar abnormalities, *J Mol Biol* 216, 657-75.

Geisterfer-Lowrance, A. A., Christe, M., Conner, D. A., Ingwall, J. S., Schoen, F. J., Seidman, C. E., and Seidman, J. G. (1996). A mouse model of familial hypertrophic cardiomyopathy, *Science* 272, 731-4.

Geisterfer-Lowrance, A. A., Kass, S., Tanigawa, G., Vosberg, H. P., McKenna, W., Seidman, C. E., and Seidman, J. G. (1990). A molecular basis for familial hypertrophic cardiomyopathy: a beta cardiac myosin heavy chain gene missense mutation, *Cell* 62, 999-1006.

Gottwald, W. (1993). *RP-HPLC für Anwender* (Weinheim, Wiley/VCH).

Gregersen, N., Bross, P., Jorgensen, M. M., Corydon, T. J., and Andresen, B. S. (2000). Defective folding and rapid degradation of mutant proteins is a common disease mechanism in genetic disorders, *J Inherit Metab Dis* 23, 441-7.

Gustafson, T. A., Markham, B. E., and Morkin, E. (1985). Analysis of thyroid hormone effects on myosin heavy chain gene expression in cardiac and soleus muscles using a novel dot-blot mRNA assay, *Biochem Biophys Res Commun* 130, 1161-7.

-
- Haberhausen, G. (1998). Polymerase-Kettenreaktion. In Bioanalytik, F. Lottspeich, and H. Zorbas, eds. (Heidelberg, Spektrum Akademischer Verlag).
- Haddon, F. W., and McLafferty, F. W. (1968). Metastable ion characteristics VII. Collision-induced metastables., *J Am Chem Soc* 90, 4745-4746.
- Hasselbach, W., and Schneider, G. (1951). Der L-Myosin- und Aktingehalt des Kaninchenmuskels., *Biochem Z* 321, 462-475.
- Hemesath, T. J., Steingrimsson, E., McGill, G., Hansen, M. J., Vaught, J., Hodgkinson, C. A., Arnheiter, H., Copeland, N. G., Jenkins, N. A., and Fisher, D. E. (1994). microphthalmia, a critical factor in melanocyte development, defines a discrete transcription factor family, *Genes Dev* 8, 2770-80.
- Hilleren, P., and Parker, R. (1999). Mechanisms of mRNA surveillance in eukaryotes, *Annu Rev Genet* 33, 229-60.
- <http://groups.google.com> (1999-2001). lightcycler.
- Ibba, M., and Soll, D. (1999). Quality control mechanisms during translation, *Science* 286, 1893-7.
- Isaacs, W. B., and Fulton, A. B. (1987). Cotranslational assembly of myosin heavy chain in developing cultured skeletal muscle, *Proc Natl Acad Sci U S A* 84, 6174-8.
- Jaenicke, T., Diederich, K. W., Haas, W., Schleich, J., Lichter, P., Pfordt, M., Bach, A., and Vosberg, H. P. (1990). The complete sequence of the human beta-myosin heavy chain gene and a comparative analysis of its product, *Genomics* 8, 194-206.
- Jarcho, J. A., McKenna, W., Pare, J. A., Solomon, S. D., Holcombe, R. F., Dickie, S., Levi, T., Donis-Keller, H., Seidman, J. G., and Seidman, C. E. (1989). Mapping a gene for familial hypertrophic cardiomyopathy to chromosome 14q1, *N Engl J Med* 321, 1372-8.
- Jennings, K. R. (1968). Collision-induced decompositions of aromatic molecular ions., *Int J Mass Spectrom Ion Phys* 1, 227-235.
- Jeschke, B., Uhl, K., Weist, B., Schroder, D., Meitinger, T., Dohlemann, C., and Vosberg, H. P. (1998). A high risk phenotype of hypertrophic cardiomyopathy associated with a compound genotype of two mutated beta-myosin heavy chain genes, *Hum Genet* 102, 299-304.

-
- Jones, W. K., Grupp, I. L., Doetschman, T., Grupp, G., Osinska, H., Hewett, T. E., Boivin, G., Gulick, J., Ng, W. A., and Robbins, J. (1996). Ablation of the murine alpha myosin heavy chain gene leads to dosage effects and functional deficits in the heart, *J Clin Invest* *98*, 1906-17.
- Kelly, D. P., and Strauss, A. W. (1994). Inherited cardiomyopathies [see comments], *N Engl J Med* *330*, 913-9.
- Kimura, A., Harada, H., Park, J. E., Nishi, H., Satoh, M., Takahashi, M., Hiroi, S., Sasaoka, T., Ohbuchi, N., Nakamura, T., Koyanagi, T., Hwang, T. H., Choo, J. A., Chung, K. S., Hasegawa, A., Nagai, R., Okazaki, O., Nakamura, H., Matsuzaki, M., Sakamoto, T., Toshima, H., Koga, Y., Imaizumi, T., and Sasazuki, T. (1997). Mutations in the cardiac troponin I gene associated with hypertrophic cardiomyopathy, *Nat Genet* *16*, 379-82.
- Ko, Y. L., Tang, T. K., Chen, J. J., Hshieh, Y. Y., Wu, C. W., and Lien, W. P. (1992). Idiopathic hypertrophic cardiomyopathy in identical twins. Morphological heterogeneity of the left ventricle, *Chest* *102*, 783-5.
- Kraft, T., Chalovich, J. M., Yu, L. C., and Brenner, B. (1995a). Parallel inhibition of active force and relaxed fiber stiffness by caldesmon fragments at physiological ionic strength and temperature conditions: additional evidence that weak cross-bridge binding to actin is an essential intermediate for force generation, *Biophys J* *68*, 2404-18.
- Kraft, T., Messerli, M., Rothen-Rutishauser, B., Perriard, J. C., Wallimann, T., and Brenner, B. (1995b). Equilibration and exchange of fluorescently labeled molecules in skinned skeletal muscle fibers visualized by confocal microscopy, *Biophys J* *69*, 1246-58.
- Lehrach, H., Diamond, D., Wozney, J. M., and Boedtger, H. (1977). RNA molecular weight determinations by gel electrophoresis under denaturing conditions, a critical reexamination, *Biochemistry* *16*, 4743-51.
- Lemahieu, V., Gastier, J. M., and Francke, U. (1999). Novel mutations in the Wiskott-Aldrich syndrome protein gene and their effects on transcriptional, translational, and clinical phenotypes, *Hum Mutat* *14*, 54-66.
- Malinchik, S., Cuda, G., Podolsky, R. J., and Horowitz, R. (1997). Isometric tension and mutant myosin heavy chain content in single skeletal myofibers from hypertrophic cardiomyopathy patients, *J Mol Cell Cardiol* *29*, 667-76.

-
- Marian, A. J., Kelly, D., Mares, A., Jr., Fitzgibbons, J., Cairra, T., Qun, T., Hill, R., Perryman, M. B., and Roberts, R. (1994). A missense mutation in the beta myosin heavy chain gene is a predictor of premature sudden death in patients with hypertrophic cardiomyopathy, *J Sports Med Phys Fitness* 34, 1-10.
- Marian, A. J., Yu, Q. T., Mann, D. L., Graham, F. L., and Roberts, R. (1995). Expression of a mutation causing hypertrophic cardiomyopathy disrupts sarcomere assembly in adult feline cardiac myocytes, *Circ Res* 77, 98-106.
- Marian, A. J., Yu, Q. T., Mares, A., Jr., Hill, R., Roberts, R., and Perryman, M. B. (1992). Detection of a new mutation in the beta-myosin heavy chain gene in an individual with hypertrophic cardiomyopathy, *J Clin Invest* 90, 2156-65.
- Marian, A. J., Yu, Q. T., Workman, R., Greve, G., and Roberts, R. (1993). Angiotensin-converting enzyme polymorphism in hypertrophic cardiomyopathy and sudden cardiac death, *Lancet* 342, 1085-6.
- Maron, B. J., Bonow, R. O., Cannon, R. O. d., Leon, M. B., and Epstein, S. E. (1987). Hypertrophic cardiomyopathy. Interrelations of clinical manifestations, pathophysiology, and therapy (2), *N Engl J Med* 316, 844-52.
- Maron, B. J., Gardin, J. M., Flack, J. M., Gidding, S. S., Kurosaki, T. T., and Bild, D. E. (1995). Prevalence of hypertrophic cardiomyopathy in a general population of young adults. Echocardiographic analysis of 4111 subjects in the CARDIA Study. Coronary Artery Risk Development in (Young) Adults [see comments], *Circulation* 92, 785-9.
- Maron, B. J., Nichols, P. F. d., Pickle, L. W., Wesley, Y. E., and Mulvihill, J. J. (1984). Patterns of inheritance in hypertrophic cardiomyopathy: assessment by M-mode and two-dimensional echocardiography, *Am J Cardiol* 53, 1087-94.
- Maron, B. J., Roberts, W. C., and Epstein, S. E. (1982). Sudden death in hypertrophic cardiomyopathy: a profile of 78 patients, *Circulation* 65, 1388-94.
- Maron, B. J., Shen, W. K., Link, M. S., Epstein, A. E., Almquist, A. K., Daubert, J. P., Bardy, G. H., Favale, S., Rea, R. F., Boriani, G., Estes, N. A., 3rd, and Spirito, P. (2000). Efficacy of implantable cardioverter-defibrillators for the prevention of sudden death in patients with hypertrophic cardiomyopathy [see comments], *N Engl J Med* 342, 365-73.

-
- Matsuoka, R., Yoshida, M. C., Kanda, N., Kimura, M., Ozasa, H., and Takao, A. (1989). Human cardiac myosin heavy chain gene mapped within chromosome region 14q11.2---q13, *Am J Med Genet* 32, 279-84.
- McKenna, W. J. (1993). Hypertrophic cardiomyopathy: an update, *Cardiologia* 38, 277-81.
- Nier, V. (1997) Nachweis und Quantifizierung von Punktmutationen auf Proteinebene am Beispiel von Myosinmutanten bei Familiärer Hypertropher Kardiomyopathie, Universität Hannover, Hannover.
- Nier, V., Schultz, I., Brenner, B., Forssmann, W., and Raida, M. (1999). Variability in the ratio of mutant to wildtype myosin heavy chain present in the soleus muscle of patients with familial hypertrophic cardiomyopathy. A new approach for the quantification of mutant to wildtype protein, *FEBS Lett* 461, 246-52.
- Nishi, H., Kimura, A., Harada, H., Adachi, K., Koga, Y., Sasazuki, T., and Toshima, H. (1994). Possible gene dose effect of a mutant cardiac beta-myosin heavy chain gene on the clinical expression of familial hypertrophic cardiomyopathy, *Biochem Biophys Res Commun* 200, 549-56.
- Nishi, H., Kimura, A., Harada, H., Koga, Y., Adachi, K., Matsuyama, K., Koyanagi, T., Yasunaga, S., Imaizumi, T., Toshima, H., and Sasazuki, T. (1995). A myosin missense mutation, not a null allele, causes familial hypertrophic cardiomyopathy [see comments], *Circulation* 91, 2911-5.
- Owen, M. C., Brennan, S. O., Lewis, J. H., and Carrell, R. W. (1983). Mutation of antitrypsin to antithrombin. alpha 1-antitrypsin Pittsburgh (358 Met leads to Arg), a fatal bleeding disorder, *N Engl J Med* 309, 694-8.
- Poetter, K., Jiang, H., Hassanzadeh, S., Master, S. R., Chang, A., Dalakas, M. C., Rayment, I., Sellers, J. R., Fananapazir, L., and Epstein, N. D. (1996). Mutations in either the essential or regulatory light chains of myosin are associated with a rare myopathy in human heart and skeletal muscle, *Nat Genet* 13, 63-9.
- Qin, H., Kemp, J., Yip, M. Y., Lam-Po-Tang, P. R., Hoh, J. F., and Morris, B. J. (1990). Localization of human cardiac beta-myosin heavy chain gene (MYH7) to chromosome 14q12 by in situ hybridization, *Cytogenet Cell Genet* 54, 74-6.

- Rayment, I., Holden, H. M., Sellers, J. R., Fananapazir, L., and Epstein, N. D. (1995). Structural interpretation of the mutations in the beta-cardiac myosin that have been implicated in familial hypertrophic cardiomyopathy, *Proc Natl Acad Sci U S A* *92*, 3864-8.
- Rayment, I., Rypniewski, W. R., Schmidt-Base, K., Smith, R., Tomchick, D. R., Benning, M. M., Winkelmann, D. A., Wesenberg, G., and Holden, H. M. (1993). Three-dimensional structure of myosin subfragment-1: a molecular motor [see comments], *Science* *261*, 50-8.
- Richard, P., Charron, P., Leclercq, C., Ledeuil, C., Carrier, L., Dubourg, O., Desnos, M., Bouhour, J. B., Schwartz, K., Daubert, J. C., Komajda, M., and Hainque, B. (2000). Homozygotes for a R869G mutation in the beta -myosin heavy chain gene have a severe form of familial hypertrophic cardiomyopathy, *J Mol Cell Cardiol* *32*, 1575-83.
- Rottbauer, W., Gautel, M., Zehelein, J., Labeit, S., Franz, W. M., Fischer, C., Vollrath, B., Mall, G., Dietz, R., Kubler, W., and Katus, H. A. (1997). Novel splice donor site mutation in the cardiac myosin-binding protein-C gene in familial hypertrophic cardiomyopathy. Characterization Of cardiac transcript and protein, *J Clin Invest* *100*, 475-82.
- Sambrook, J., and Russell, D. W. (2001). *Molecular Cloning, Vol 1, 3rd edn* (Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Schiaffino, S., and Reggiani, C. (1996). Molecular diversity of myofibrillar proteins: gene regulation and functional significance, *Physiol Rev* *76*, 371-423.
- Schwer, C. (1998). Kapillarelektrophorese. In *Bioanalytik*, F. Lottspeich, and H. Zorbas, eds. (Heidelberg, Berlin, Spektrum Akademischer Verlag), pp. 253-284.
- Solomon, S. D., Geisterfer-Lowrance, A. A., Vosberg, H. P., Hiller, G., Jarcho, J. A., Morton, C. C., McBride, W. O., Mitchell, A. L., Bale, A. E., McKenna, W. J., Seidman, J. G., and Seidman, C. E. (1990). A locus for familial hypertrophic cardiomyopathy is closely linked to the cardiac myosin heavy chain genes, CRI-L436, and CRI-L329 on chromosome 14 at q11-q12, *Am J Hum Genet* *47*, 389-94.
- Spirito, P., Seidman, C. E., McKenna, W. J., and Maron, B. J. (1997). The management of hypertrophic cardiomyopathy [see comments], *N Engl J Med* *336*, 775-85.
- Strachan, T., and Read, A. P. (1996). *Molekulare Humangenetik* (Heidelberg, Spektrum Akademischer Verlag).

- Sweeney, H. L., Straceski, A. J., Leinwand, L. A., Tikunov, B. A., and Faust, L. (1994). Heterologous expression of a cardiomyopathic myosin that is defective in its actin interaction, *J Biol Chem* 269, 1603-5.
- Tanaka, K., Tamura, T., Yoshimura, T., and Ichihara, A. (1992). Proteasomes: protein and gene structures, *New Biol* 4, 173-87.
- Tesson, F., Dufour, C., Moolman, J. C., Carrier, L., al-Mahdawi, S., Chojnowska, L., Dubourg, O., Soubrier, E., Brink, P., Komajda, M., Guicheney, P., Schwartz, K., and Feingold, J. (1997). The influence of the angiotensin I converting enzyme genotype in familial hypertrophic cardiomyopathy varies with the disease gene mutation, *J Mol Cell Cardiol* 29, 831-8.
- Tesson, F., Richard, P., Charron, P., Mathieu, B., Cruaud, C., Carrier, L., Dubourg, O., Lautie, N., Desnos, M., Millaire, A., Isnard, R., Hagege, A. A., Bouhour, J. B., Bennaceur, M., Hainque, B., Guicheney, P., Schwartz, K., and Komajda, M. (1998). Genotype-phenotype analysis in four families with mutations in beta-myosin heavy chain gene responsible for familial hypertrophic cardiomyopathy, *Hum Mutat* 12, 385-92.
- Thierfelder, L., Watkins, H., MacRae, C., Lamas, R., McKenna, W., Vosberg, H. P., Seidman, J. G., and Seidman, C. E. (1994). Alpha-tropomyosin and cardiac troponin T mutations cause familial hypertrophic cardiomyopathy: a disease of the sarcomere, *Cell* 77, 701-12.
- Venter, J. C., Adams, M. D., Myers, E. W., Li, P. W., Mural, R. J., Sutton, G. G., Smith, H. O., Yandell, M., Evans, C. A., Holt, R. A., Gocayne, J. D., Amanatides, P., Ballew, R. M., Huson, D. H., Wortman, J. R., Zhang, Q., Kodira, C. D., Zheng, X. H., Chen, L., Skupski, M., Subramanian, G., Thomas, P. D., Zhang, J., Gabor Miklos, G. L., Nelson, C., Broder, S., Clark, A. G., Nadeau, J., McKusick, V. A., Zinder, N., Levine, A. J., Roberts, R. J., Simon, M., Slayman, C., Hunkapiller, M., Bolanos, R., Delcher, A., Dew, I., Fasulo, D., Flanigan, M., Florea, L., Halpern, A., Hannenhalli, S., Kravitz, S., Levy, S., Mobarry, C., Reinert, K., Remington, K., Abu-Threideh, J., Beasley, E., Biddick, K., Bonazzi, V., Brandon, R., Cargill, M., Chandramouliswaran, I., Charlab, R., Chaturvedi, K., Deng, Z., Di Francesco, V., Dunn, P., Eilbeck, K., Evangelista, C., Gabrielian, A. E., Gan, W., Ge, W., Gong, F., Gu, Z., Guan, P., Heiman, T. J., Higgins, M. E., Ji, R. R., Ke, Z., Ketchum, K. A., Lai, Z., Lei, Y., Li, Z., Li, J., Liang, Y., Lin, X., Lu, F., Merkulov, G. V., Milshina, N., Moore, H. M., Naik, A. K., Narayan, V. A., Neelam, B., Nuskern, D., Rusch, D. B.,

Salzberg, S., Shao, W., Shue, B., Sun, J., Wang, Z., Wang, A., Wang, X., Wang, J., Wei, M., Wides, R., Xiao, C., Yan, C., Yao, A., Ye, J., Zhan, M., Zhang, W., Zhang, H., Zhao, Q., Zheng, L., Zhong, F., Zhong, W., Zhu, S., Zhao, S., Gilbert, D., Baumhueter, S., Spier, G., Carter, C., Cravchik, A., Woodage, T., Ali, F., An, H., Awe, A., Baldwin, D., Baden, H., Barnstead, M., Barrow, I., Beeson, K., Busam, D., Carver, A., Center, A., Cheng, M. L., Curry, L., Danaher, S., Davenport, L., Desilets, R., Dietz, S., Dodson, K., Doup, L., Ferreira, S., Garg, N., Gluecksmann, A., Hart, B., Haynes, J., Haynes, C., Heiner, C., Hladun, S., Hostin, D., Houck, J., Howland, T., Ibegwam, C., Johnson, J., Kalush, F., Kline, L., Koduru, S., Love, A., Mann, F., May, D., McCawley, S., McIntosh, T., McMullen, I., Moy, M., Moy, L., Murphy, B., Nelson, K., Pfannkoch, C., Pratts, E., Puri, V., Qureshi, H., Reardon, M., Rodriguez, R., Rogers, Y. H., Romblad, D., Ruhfel, B., Scott, R., Sitter, C., Smallwood, M., Stewart, E., Strong, R., Suh, E., Thomas, R., Tint, N. N., Tse, S., Vech, C., Wang, G., Wetter, J., Williams, S., Williams, M., Windsor, S., Winn-Deen, E., Wolfe, K., Zaveri, J., Zaveri, K., Abril, J. F., Guigo, R., Campbell, M. J., Sjolander, K. V., Karlak, B., Kejariwal, A., Mi, H., Lazareva, B., Hatton, T., Narechania, A., Diemer, K., Muruganujan, A., Guo, N., Sato, S., Bafna, V., Istrail, S., Lippert, R., Schwartz, R., Walenz, B., Yooseph, S., Allen, D., Basu, A., Baxendale, J., Blick, L., Caminha, M., Carnes-Stine, J., Caulk, P., Chiang, Y. H., Coyne, M., Dahlke, C., Mays, A., Dombroski, M., Donnelly, M., Ely, D., Esparham, S., Fosler, C., Gire, H., Glanowski, S., Glasser, K., Glodek, A., Gorokhov, M., Graham, K., Gropman, B., Harris, M., Heil, J., Henderson, S., Hoover, J., Jennings, D., Jordan, C., Jordan, J., Kasha, J., Kagan, L., Kraft, C., Levitsky, A., Lewis, M., Liu, X., Lopez, J., Ma, D., Majoros, W., McDaniel, J., Murphy, S., Newman, M., Nguyen, T., Nguyen, N., Nodell, M., Pan, S., Peck, J., Peterson, M., Rowe, W., Sanders, R., Scott, J., Simpson, M., Smith, T., Sprague, A., Stockwell, T., Turner, R., Venter, E., Wang, M., Wen, M., Wu, D., Wu, M., Xia, A., Zandieh, A., and Zhu, X. (2001). The sequence of the human genome, *Science* 291, 1304-51.

Vikstrom, K. L., Factor, S. M., and Leinwand, L. A. (1996). Mice expressing mutant myosin heavy chains are a model for familial hypertrophic cardiomyopathy, *Mol Med* 2, 556-67.

Voet, D., and Voet, J. G. (1994). *Biochemie* (Weinheim, VCH).

Watkins, H. (2000). Sudden death in hypertrophic cardiomyopathy [editorial; comment], *N Engl J Med* 342, 422-4.

-
- Watkins, H., Conner, D., Thierfelder, L., Jarcho, J. A., MacRae, C., McKenna, W. J., Maron, B. J., Seidman, J. G., and Seidman, C. E. (1995). Mutations in the cardiac myosin binding protein-C gene on chromosome 11 cause familial hypertrophic cardiomyopathy, *Nat Genet* *11*, 434-7.
- Watkins, H., Rosenzweig, A., Hwang, D. S., Levi, T., McKenna, W., Seidman, C. E., and Seidman, J. G. (1992). Characteristics and prognostic implications of myosin missense mutations in familial hypertrophic cardiomyopathy [see comments], *N Engl J Med* *326*, 1108-14.
- Wigle, E. D., Rakowski, H., Kimball, B. P., and Williams, W. G. (1995). Hypertrophic cardiomyopathy. Clinical spectrum and treatment [see comments], *Circulation* *92*, 1680-92.
- Wilkie, A. O. (1994). The molecular basis of genetic dominance, *J Med Genet* *31*, 89-98.
- Yoneya, K., Okamoto, H., Machida, M., Onozuka, H., Noguchi, M., Mikami, T., Kawaguchi, H., Murakami, M., Uede, T., and Kitabatake, A. (1995). Angiotensin-converting enzyme gene polymorphism in Japanese patients with hypertrophic cardiomyopathy, *Am Heart J* *130*, 1089-93.
- Yu, L. C., and Brenner, B. (1989). Structures of actomyosin crossbridges in relaxed and rigor muscle fibers, *Biophys J* *55*, 441-53.

Veröffentlichungen

Nier, V., Schultz, I., Brenner, B., Forssmann, W., and Raida, M. (1999). Variability in the ratio of mutant to wildtype myosin heavy chain present in the soleus muscle of patients with familial hypertrophic cardiomyopathy. A new approach for the quantification of mutant to wildtype protein, FEBS Lett 461, 246-52.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, Imke Schulte, geboren am 14.1.1971 in Bremerhaven, an Eides statt, dass ich die von mir eingereichte Dissertation mit dem Titel:

„Variabilität des Schweregrads bei Familiärer Hypertropher Kardiomyopathie. Quantifizierung von Wildtyp und Mutante auf mRNA- und Proteinebene“

selbständig verfasst und die benutzten Hilfsmittel vollständig angegeben habe.

Gleichzeitig versichere ich an Eides statt, dass die in dieser Dissertation aufgeführten Ergebnisse hiermit zum erstenmal in einer Prüfungsarbeit erwähnt sind und nicht bereits schon zuvor für eine Diplomarbeit o.ä. verwendet wurden.

Hannover, den 16.5.2001

Danksagung

Herrn Professor Dr. B. Brenner danke ich ganz herzlich für die sehr interessante Themenstellung, die fachkundige Betreuung und seine ständige Diskussionsbereitschaft. Seine wertvollen Anregungen haben maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Besonders möchte ich mich dafür bedanken, dass er meinen USA-Aufenthalt ermöglicht hat.

Bei Herrn Professor Dr. W. Müller bedanke ich mich für seine Hilfe und Unterstützung.

Herrn Professor W. J. McKenna vom Departement of Cardiological Sciences, St. George's Hospital Medical School, University of London danke ich für die Charakterisierung und Betreuung der FHC-Familien. Durch deren Kooperationsbereitschaft wurden die Untersuchungen dieser Arbeit überhaupt möglich.

Herrn Dr. G. Winkler der Neurologischen Klinik des Universitätskrankenhauses Eppendorf danke ich für die umfassende und komplexe histologische Untersuchung des Biopsiematerials der FHC-Patienten.

Herrn Professor Jon G. Seidman des Departments of Genetics, HHMI der Harvard Medical School bin ich sehr dankbar für seine unentbehrlichen Tipps und für die fantastische Möglichkeit, dass ich in seinem Labor die für meine Arbeit wichtigsten molekularbiologischen Techniken vertiefen konnte.

Dem Boehringer Ingelheim Fonds danke ich für die finanzielle Unterstützung des Aufenthalts in den USA.

Dem HILF-Projekt der Medizinischen Hochschule Hannover verdanke ich die Laborausstattung für die Durchführung der molekularbiologischen Arbeiten.

Herrn Professor Dr. W.-G. Forssmann danke ich für die Möglichkeit, dass der Großteil der proteinchemischen Quantifizierung am Niedersächsischen Institut für Peptidforschung durchgeführt werden konnte.

Herrn Dr. M. Raida danke ich besonders für die Einführung in die HPLC-, MS- und CE-Technik.

Für die Peptidsynthese danke ich Herrn PD Dr. Knut Adermann.

Volker (Dr. V. Nier) danke ich ganz besonders für sein Dasein und die Betreuung in der Anfangsphase meiner Zeit in Hannover. Auch wenn er es wahrscheinlich nicht wusste, hat er maßgeblich dazu beigetragen, mein „Chemie-Trauma“ zu bewältigen.

Terry (PD Dr. T. Kraft) bin ich sehr dankbar für ihre Unterstützung und ständige Gesprächsbereitschaft.

Eva danke ich, neben der Hilfe in allen Verwaltungsangelegenheiten, vor allem für Ihr offenes Ohr und die intensiven Gespräche, die wir geführt haben und hoffentlich noch führen werden.

Meinen Kollegen Birgit, Claudia, Enke, Petra, Terry, Thommy und Tim verdanke ich das angenehme und freundschaftliche Arbeitsklima im Labor.

Mechthild Hoppe bin ich zu großem Dank für die Bewältigung meiner Literatursammlung verpflichtet.

Dirk, Birgit, Tim und Claudia bin ich besonders dankbar für die Erweiterung meines Wissens in puncto Informations-Technologie...

Meinen Eltern danke ich sehr herzlich für ihre anhaltende Motivierung und Unterstützung, vor allem in nicht so schönen Zeiten.

Dirk bin ich zutiefst dankbar, dass er sich so viel Zeit für das Korrekturlesen und die sprachliche Verfeinerung dieser Arbeit genommen hat. Außerdem danke ich ihm für seine Geduld bei meinen ständigen Anrufen wegen irgendwelcher, furchtbar dringender Sachen. Ich bin sehr glücklich, dass wir es geschafft haben, den inzwischen schon ziemlich langen Weg zusammenzugehen und dass noch keiner von uns abgebogen ist. Wer weiß, wohin er als nächstes führen wird...

IMKE SCHULTE

geb. Schultz

Winsener Straße 34

30625 Hannover

PERSÖNLICHE ANGABEN:

-
- Familienstand: verheiratet mit Dirk Schulte, Dipl.-Chem., Dipl. Journ.
 - Staatsangehörigkeit: deutsch
 - Geburtstag und -ort: 14. Januar 1971 in Bremerhaven

AUSBILDUNG

1977 - 1981	Grundschule Schiffdorf
1981 - 1983	Orientierungsstufe Schiffdorf
1983 - 1990	Gymnasium Wesermünde
Mai 1990	Erwerb der Allgemeinen Hochschulreife
WS 1990	Beginn des Studiums der Chemie an der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster
Juni 1996	Mündliche Chemiker-Diplomprüfung
Juli 1996	Mündliche Chemiker-Diplomprüfung im Zusatzfach Anorganische Chemie
August 1996 bis April 1997	Diplomarbeit bei Frau Prof. L. Bruckner-Tuderman an der Klinik und Poliklinik für Hautkrankheiten, Allg. Dermatologie und Venerologie und am Institut für Biochemie der WWU Münster
September 1997	Beginn der Promotion in der Abteilung für Molekular- und Zellphysiologie an der Medizinischen Hochschule Hannover
Februar bis Mai 2000	Forschungsaufenthalt im Seidman Lab, Departement of Genetics, Harvard Medical School, Boston gefördert durch den Boehringer Ingelheim Fonds