

Aus dem Universitätsklinikum Münster  
Institut für Genetik von Herzerkrankungen (IfGH) Münster  
- Direktor: Univ.-Prof. Dr. Eric Schulze-Bahr -

# **Arrhythmogene (unklassifizierte) Kardiomyopathieformen (AUCM) – Aufklärung genetischer Ursachen**

---

**INAUGURAL – DISSERTATION**

zur Erlangung des doctor medicinae  
der Medizinischen Fakultät  
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorlegt von

**Schulze Lammers, Sophia Caroline**

**aus Witten**

- 2022 -

---

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der  
Westfälischen Wilhelms-Universität Münster



---

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Frank Ulrich Müller

1. Berichterstatter: Univ.- Prof. Dr. med. Eric Schulze-Bahr

2. Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. rer. medic. Dr. med. Lars Stegger

Tag der mündlichen Prüfung: 27.01.2022

Aus dem Universitätsklinikum Münster

Institut für Genetik von Herzerkrankungen

- Direktor: Univ.-Prof. Dr. Eric Schulze-Bahr -

I. Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Eric Schulze-Bahr

2. Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. rer. medic. Dr. med. Lars Stegger

## ZUSAMMENFASSUNG

Schulze Lammers, Sophia Caroline

**Arrhythmogene (unklassifizierte) Kardiomyopathieformen (AUCM) –**

### **Aufklärung genetischer Ursachen**

Im Rahmen Arbeit wurden Patienten molekulargenetisch untersucht, bei welchen eine strukturelle und/oder arrhythmogene Herzerkrankung vorlag, die aufgrund eines untypischen klinischen Phänotyps nicht in eine der bekannten Kardiomyopathien eingeordnet werden konnte und folglich als arrhythmogene unklassifizierte Kardiomyopathie (AUCM) bezeichnet wurde. Ziel der Arbeit war es zu ermitteln, ob diesen, als AUCM bezeichneten Herzerkrankungen genetische Ursachen zu Grunde liegen und welche Krankheitsgene hier ursächlich sind. Die molekulargenetische Analyse erfolgte mittels eines Genpanel-basierten NGS-Ansatzes, mit dem bekannte kardiale Krankheitsgene parallel analysiert wurden. Zusammenfassend wurde bei ca. 61% der untersuchten Patienten eine (mögliche) genetische Ursache detektiert, wobei Mutationen nicht auf ein Krankheitsgen beschränkt, sondern eine Vielzahl von Genen betroffen waren. Hervorzuheben sind dabei die ARVC/D-Gene (DSP, DSG2, PKP2, DSC2), bei welchen sich insgesamt 30% aller detektierten, potentiell-kausalen Genvarianten fanden. Insgesamt scheint die AUCM eine starke genetische Komponente zu haben, wodurch bei genetisch betroffenen Personen ein präventives Familien-Screening der Angehörigen möglich wird. Des Weiteren wurde eine Methode etabliert, mit welcher überprüft werden kann, ob es im Rahmen der DNA-Diagnostik zu einem inzidentellen Vertauschen einer Probe gekommen ist. Da bis zu zehn verschiedene DNA-Proben in einer NGS Analyse eingesetzt werden, ist es wichtig, ein Verfahren zu finden, mit dem eine Probe eindeutig identifizierbar ist. Hierfür wurde eine Multiplex HRM-PCR etabliert, über die eine Kombination von vier Sequenzvariationen in einem Ansatz bestimmt werden kann. Sofern die Genotypen aus Multiplex HRM und Panelsequenzierung übereinstimmen, kann eine Probenvertauschung mit einer Sensitivität von 95% ausgeschlossen werden.

Tag der mündlichen Prüfung: 27.01.2022

# Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die Arbeit selbstständig angefertigt, nicht anderweitig für Prüfungszwecke vorgelegt, alle benutzten Quellen und Hilfsmittel angegeben sowie wörtliche und sinngemäße Zitate gekennzeichnet habe.

\_Münster, 21.01.2022\_

Ort, Datum

\_S.Schulze Lammers\_\_\_\_\_

Unterschrift

# Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung .....	1
1.1.    Hintergrund der Arbeit .....	1
1.2.    Kardiomyopathien .....	2
1.3.    Ziel der Arbeit .....	12
2. Material und Methodik .....	13
2.1 Verwendete Materialien .....	13
2.1.1 Geräte .....	13
2.1.2 Chemikalien und Kits .....	14
2.1.3 Software .....	15
2.1.4 Verbrauchsmaterialien .....	15
2.2 Patientenkollektiv .....	16
2.3 Methodik .....	17
2.3.1 <i>Next-Generation Sequencing</i> (NGS) .....	17
2.3.2    DNA-Konzentrationsbestimmung und -Quantifizierung .....	20
2.3.3 <i>library</i> Präparation .....	21
2.3.4    Quantitative <i>Real Time</i> -PCR .....	31
2.3.5    Bioinformatische Auswertung der NGS Daten .....	32
2.3.6    Beurteilung der detektierten Varianten .....	33
2.3.7    Pathogenitätsvorhersageprogramme .....	33
2.3.8    Validierung der Variationen mittels Sanger-Sequenzierung .....	35
2.3.9    DNA-Isolation .....	41
2.3.10    HRM PCR Analyse .....	42
2.3.11    Untersuchte SNPs in der HRM-PCR .....	46
2.3.12    Mathematische Grundlage des Verfahrens .....	48
3. Ergebnisse .....	51

3.1 Identifizierung von kausalen Genmutationen .....	51
3.1.1 Sequenzierung und Datenauswertung bei 14 AUCM Patienten .....	51
3.1.2 In silico – Analyse der Pathogenität .....	52
3.1.2 Beurteilung der Pathogenität der Sequenzvarianten.....	56
3.1.3 Retrospektive Auswertung der identifizierten Genvarianten in einem Patientenkollektives von 43 AUCM Patienten.....	69
3.1.4 Die AUCM ist eine heterogene Erkrankung.....	71
3.2 Etablierung der <i>Multiplex</i> HRM-PCR zum Ausschluss von Probenverwechslungen in der <i>NGS</i> Diagnostik	76
3.2.1 Etablierung der <i>Multiplex</i> HRM Analysen – Erster Ansatz .....	77
3.2.2 Etablierung der <i>Multiplex</i> HRM Analysen – Zweiter Ansatz.....	83
3.2.3 Validierung der <i>Multiplex</i> HRM-PCR.....	88
3.2.4 Berechnung der <i>Design Accuracy</i> .....	92
4. Diskussion .....	93
4.1 Die AUCM kann genetisch bedingt sein.....	93
4.2 Mutationen in Strukturgenen bedingen Kardiomyopathien .....	95
4.3 Zuordnung der arrhythmogenen unklassifizierten Kardiomyopathie .....	97
4.4 Gemeinsamkeiten und Unterschiede in Geno- und Phänotypen .....	97
4.5 Die AUCM ist eine Multigenerkrankung .....	99
4.6 Mithilfe der HRM-PCR lassen sich Probenverwechslungen ausschließen .....	101
5. Fazit und Ausblick.....	105
6. Literaturverzeichnis.....	106
Lebenslauf .....	111
Danksagung.....	112
A. Anhang.....	I
B. Abbildungsverzeichnis .....	X
C. Tabellenverzeichnis.....	XIII
D. Abkürzungsverzeichnis .....	XV

# 1. Einleitung

## 1.1. Hintergrund der Arbeit

Kardiomyopathien sind Herzmuskelerkrankungen unterschiedlicher Ätiologie und klinischer Ausprägung. Die Weltgesundheitsorganisation (WHO) klassifizierte 1995 die Kardiomyopathien in fünf verschiedene Gruppen: dilatative Kardiomyopathie (DCM), hypertrophe Kardiomyopathie (HCM), restriktive Kardiomyopathie (RCM), arrhythmogene rechtsventrikuläre Kardiomyopathie/Dysplasie (ARVC/D) und unklassifizierte Kardiomyopathie (1). In den letzten Jahren ist jedoch immer deutlicher geworden, dass es in Familien überlappende Phänotypen gibt, wie beispielsweise die HCM mit dilatativer Verlaufsform oder die ARVC/D mit linksventrikulärer Beteiligung (2). Zum Teil sind solche „überlappenden“ Kardiomyopathien klinisch jedoch noch unklassifiziert, weswegen eine Revision der Klassifikation diskutiert wird. So wird seit einigen Jahren von der ARVC vermehrt als eine Untergruppe der sog. arrhythmogenen Kardiomyopathien gesprochen, da zunehmend weitere arrhythmogene Formen beobachtet wurden. Der Begriff der arrhythmogenen Kardiomyopathien (ACM) wird bereits von zahlreichen Fachzeitschriften verwendet, wie dem *Rhythm Journal* und dem *Circulation Research* (3, 4).

In der Spezialambulanz des Institutes für Genetik von Herzerkrankungen (IfGH) am Universitätsklinikum Münster (UKM) sind in den letzten Jahren zunehmend Patienten mit einer Kardiomyopathie identifiziert worden, die einen primär arrhythmogenen, zum Teil sehr malignen Verlauf (Kammerflimmern, SCD) zeigten und zwar der Großteil vor dem 40. Lebensjahr. Typischerweise manifestieren sich Kardiomyopathien erst nach dem 40. Lebensjahr, sodass bei dieser Kardiomyopathie-Form von einem besonders schnellen und aggressiven Verlauf ausgegangen werden muss.

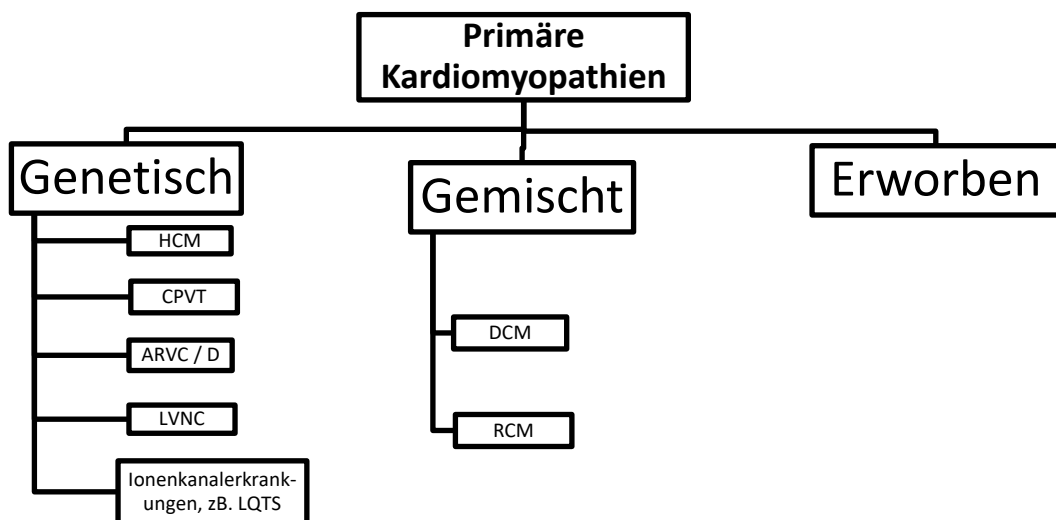
In dem oben beschriebenen Kollektiv war die kardiovaskuläre Bildgebung nicht für eine bestimmte Kardiomyopathie wegweisend und ebenso war die Ätiologie der Erkrankung ungeklärt. Die sogenannte arrhythmogene unklassifizierte Kardiomyopathie, kurz AUCM, stellt somit einen neuen Phänotyp dar, der genetisch und klinisch noch unzureichend aufgeklärt ist. Es stellte sich die Frage, ob die Erkrankung eine genetische Komponente ausweist und welche Krankheitsgene beteiligt sind.



## 1.2 Kardiomyopathien

Mit Kardiomyopathien werden nach WHO-Definition strukturelle Erkrankungen des Herzmuskels beschrieben. In der Literatur wird der Begriff uneinheitlich verwendet. Neben der WHO-Klassifikation von 1995 ist die aktuellere Definition der *American Heart Association (AHA)* sehr verbreitet, welche 2006 Kardiomyopathien als eine ‚heterogene Gruppe von Erkrankungen des Myokards assoziiert mit mechanischer und/oder elektrischer Dysfunktion definierte‘ (5). Kardiomyopathien weisen meistens, aber nicht zwingend, Hypertrophie und/oder Dilatation auf und entstehen durch eine vielfältige Genese, häufig jedoch eine genetische (6). Ebenso unterscheidet die *AHA* in primäre und sekundäre Kardiomyopathien. Letztere sind Folgen systemischer Erkrankungen, wie arterieller Hypertension oder Klappenerkrankungen, und treten deutlich häufiger auf. In der *AHA*-Klassifikation ist die AUCM bisher nicht klassifiziert, ist aber sehr wahrscheinlich bei den primären Kardiomyopathien einzugliedern.

Die primären Kardiomyopathien lassen sich nach der *AHA*-Klassifikation in genetische, erworbene und gemischte Kardiomyopathien unterscheiden. Letztere werden so bezeichnet, da diese Formen hauptsächlich nicht-genetisch sind, aber familiäre Fälle bekannt sind (6). Eine Übersicht über die primären Kardiomyopathien nach der *AHA*-Klassifikation ist in Abb. 1 zu sehen.



**Abbildung 1: Einteilung der primären Kardiomyopathien<sup>1</sup>**

*HCM: hypertrophe Kardiomyopathie; CPVT: catecholaminerge polymorphe ventrikuläre Tachycardie ARVC/D: arrhythmogene rechtsventrikuläre Kardiomyopathie/Dysfunktion; LVNC: linksventrikuläre noncompaction Kardiomyopathie; LQTS: Long QT Syndrom; DCM: dilatative Kardiomyopathie; RCM: restriktive Kardiomyopathie*

<sup>1</sup> Selbst erstellt, nach *AHA*-Definition

Ein relevantes Charakteristikum der primären Kardiomyopathien ist die altersabhängige Penetranz. Das bedeutet, dass Betroffene mit der kausalen Genmutation zum Zeitpunkt der genetischen Diagnostik keine oder nur geringe Zeichen ihrer Erkrankung aufweisen können, es jedoch im weiteren Verlauf zur Entwicklung von Symptomen kommt. Ebenso können bestimmte Kofaktoren eine symptomatische Manifestation der Krankheit auslösen, wie beispielsweise die Veranlagung zur DCM zusammen mit einer Schwangerschaft zur Entwicklung einer Peripartum-Kardiomyopathie führen kann (6).

Kardiomyopathien führen häufig zu Herzversagen, welches eine Herztransplantation notwendig machen kann, oder sogar zum plötzlichen Herztod des Patienten, aufgrund von bösartigen ventrikulären Arrhythmien (6). Der plötzliche Herztod wird klassischerweise definiert als ein unerwarteter, natürlicher Tod durch Herzversagen aus kardialer Ursache (7). Die Inzidenz eines solchen *sudden cardiac death* (SCD) wird in der Literatur mit etwa 0,0028% bei nicht-selektierten Patienten angegeben (8). Somit stellt der SCD eine seltene, meist aber besonders tragische Todesursache dar und wird bei jüngeren Menschen (<35. Lebensjahr) oftmals durch strukturelle Herzerkrankungen verursacht.

Insgesamt ist sowohl aufgrund des erhöhten SCD-Risikos als auch wegen der altersabhängigen Penetranz, welche aufgrund fehlender Symptomatik die Diagnose und ggf. eine frühzeitige Therapie verhindert, die Kenntnis der für die Erkrankung ursächlichen Genmutation enorm wichtig, da sie es erlaubt durch Screening-Untersuchungen Mutationsträger zu identifizieren und diese adäquat medizinisch zu betreuen.

Im Folgenden werden drei Kardiomyopathien (DCM, CPVT, ARVC/D) gesondert erläutert, da diese die Kardiomyopathien sind, die in besonderem Maße mit Arrhythmien assoziiert sind. Alle drei vorgestellten Kardiomyopathien ähneln jeweils unterschiedlich stark in ihrem Phänotyp der AUCM. Zuletzt wird auch die AUCM noch einmal erläutert. Die AUCM stellt sich in der Regel als eine Mischung mehrerer Kardiomyopathieformen (insbesondere der im Folgenden erläuterten) dar, weswegen es nicht möglich ist, solche Patienten konkret einer der Kardiomyopathien zuzuordnen. Andererseits soll auch nicht auf eine Diagnose verzichtet werden, da es sich zum Teil um behandlungsintensive, potentiell-maligne Krankheitsbilder handelt, weshalb die Bezeichnung der arrhythmogenen unklassifizierten Kardiomyopathie etabliert wurde.

## Dilatative Kardiomyopathie

Als dilatative („zur Erweiterung führend“) Kardiomyopathie bezeichnet man definitionsgemäß eine Kombination aus linksventrikulärer (LV) bzw. biventrikulärer Dilatation und systolischer Dysfunktion, definiert als abnormale LV-Ejektionsfraktion, bei physiologischem Füllungsverhalten (5). Die Wand des linken Ventrikels wird fortschreitend dünner und schwächer (vgl. Abb. 2), wodurch das Herz nicht mehr ausreichend Blut für die adäquate Versorgung des Körpers auswerfen kann (9). Die dilatative Kardiomyopathie (DCM) ist die zweithäufigste Kardiomyopathie-Form und eine vielmalige Ursache für Herzversagen, Transplantation und Tod (7, 10). Für DCM-Patienten beträgt das Risiko, einen plötzlichen Herztod zu erleiden 2,0 bis 3,6% pro Jahr (11). Die DCM tritt oftmals familiär gehäuft auf und kann genetische oder nicht-genetische Ursache haben.

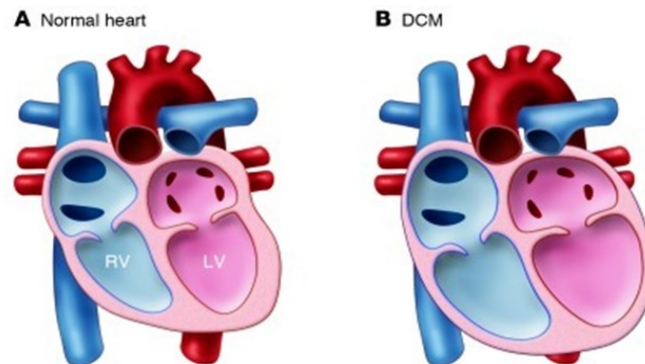
Taylor et al. definierten 2006 zwei Hauptkriterien sowie sechs Nebenkriterien zur Diagnosestellung einer DCM (12). So gehört a) eine Ejektionsfraktion von weniger als 45% (entspricht >zwei Standardabweichungen vom Normalwert) und b) ein linksventrikulärer enddiastolischer Durchmesser (LVEDD) von mehr als 117% des Normwertes zu den beiden Hauptkriterien. Nebenkriterien sind beispielsweise unerklärliche supraventrikuläre Arrhythmien vor dem 50. Lebensjahr. Eine familiäre dilatative Kardiomyopathie ist definiert als Präsenz von a) zwei oder mehr Verwandten mit DCM (nach den oben genannten Kriterien) oder b) von einem Verwandten eines DCM-Patienten mit ungeklärtem plötzlichen Tod vor dem 35. Lebensjahr (12, 13).

Die Prävalenz der DCM liegt bei 1:2500 mit einer Inzidenz von 7/100.000/Jahr (12). Die Inzidenz der DCM ist bei Männern höher und steigt generell mit dem Alter an (14). Die Diagnose der DCM wird in der Regel durch zweidimensionale Echokardiographie gestellt und erfolgt meist erst im symptomatischen Stadium (in der Regel 3.-4. Lebensdekade).

Die Ursachen der DCM sind vielfältig: neben der Ischämie (bedingt 50% der DCM-Fälle) kann sie metabolisch, immunologisch, genetisch, durch Toxine oder aufgrund arterieller Hypertension entstehen. Nicht-ischämische DCM ist in 20-35% der Fälle familiär gehäuft (14). Insgesamt ist die DCM häufig sekundär verursacht (7). Daher ist es wichtig, vor jeglicher genetischen Diagnostik eine sekundäre DCM möglichst vollständig auszuschließen.

Genetisch bedingte dilatative Kardiomyopathien treten mit unvollständiger und altersabhängiger Penetranz auf und werden durch eine vielfältige Gruppe aus über 50 Genloci verursacht (7). Nur bei etwa einem Drittel aller DCM-Patienten gelingt eine genetische Aufklärung. Am häufigsten ist die autosomal-dominante Variante. Dabei sind in der Regel kontraktile Elemente des Sarkomers betroffen,

welche teilweise auch an der Pathogenese einer hypertrophen Kardiomyopathie beteiligt sind (6). Die höchste kausale Mutationsfrequenz bei der DCM weist mit 20-25% das TTN-Gen, kodierend für Titin, auf, gefolgt von dem Gen für Lamin A/C (LMNA, 6%) und dem Gen für eine schwere Kette des Myosins (MYH7, 4%) (7). Möglicherweise ist mehr als eine einzelne Genmutation kausal für die Krankheitsentstehung, was auch die starke Variation der Penetranz in manchen Familien erklären würde, gleichzeitig aber eine Herausforderung bei der genetischen Analyse darstellt (15).



**Abbildung 2: Schematische Darstellung der DCM im Vergleich zum gesunden Herzen**

**A:** die normale Herzmorphologie, **B:** Herzmorphologie bei DCM mit Dilatation des linken Ventrikels, RV: rechter Ventrikel; LV: linker Ventrikel (Abbildung modifiziert nach McNally et al. 2013 (14))

## **Catecholaminerge polymorphe ventrikuläre Tachykardie (CPVT)**

Die CPVT ist eine seltene arrhythmogene Erkrankung, welche durch anstrengungs- oder stress-induzierte („adrenerg-getriggerte“ (7)) ventrikuläre Tachyarrhythmien charakterisiert ist, die zu Synkopen oder schlimmstenfalls zum plötzlichen Herztod führen können (16). Die CPVT zählt zu den primären elektrischen Herzerkrankungen, da sich bei den Betroffenen keinerlei klinische oder diagnostische Zeichen einer ischämischen oder strukturellen Kardiomyopathie feststellen lassen (7).

Die Inzidenz der CPVT liegt bei etwa 1:10.000 (17). Die Betroffenen sind überwiegend unter 40 Jahren alt, so manifestiert sich die Krankheit oft bereits in der Kindheit oder frühen Adoleszenz. Die Prognose der CPVT ist ungünstig, so sterben etwa 40% der Patienten innerhalb von 10 Jahren nach Diagnosestellung. Zudem stellt der plötzliche Herztod oftmals das erste (und letale) Symptom der Erkrankung dar (18). Ohne Therapie kommt es bei 20 bis 30% der Betroffenen vor dem 30. Lebensjahr zum SCD, weshalb gezielte Diagnostik sowie Früherkennung durch Genotypisierung überaus wichtig sind.

Die Erkrankung ist erblich, so sind zahlreiche kausale Genmutationen bekannt. Bei phänotypisch eindeutiger CPVT werden etwa 70-80% der Patienten genotypisch positiv getestet (19). Bei 50-70% der genotypisierten Patienten findet sich eine Mutation im Ryanodin Rezeptor 2 - (RYR2) oder im Calsequestrin 2 - (CASQ2) Gen (16, 19). Die RYR2-Mutationen sind verantwortlich für die autosomal dominante Form, welche deutlich häufiger vorkommt, wohingegen die CASQ2-Mutationen kausal für die seltenere, rezessive Variante sind (16). Bei der CPVT sind Schlüsselkomponenten der Calcium-vermittelten Calcium-Freisetzung mutiert: So kommt es durch die Mutationen zu einem erhöhten diastolischen Calcium-Einstrom, welcher einen Calcium-Überschuss in den Kardiomyozyten verursacht (20). Dies resultiert wiederum in einer erhöhten Aktivität der Kardiomyozyten aufgrund der verspäteten Nach-Depolarisation (16). Die Betroffenen zeigen ein normales Ruhe-EKG, bei einem Belastungs-EKG offenbaren sich jedoch monomorphe und/oder bidirektionale ventrikuläre Extrasystolen (VES), welche in ventrikuläre Tachykardien übergehen können (7). Bei bidirektionalen VT handelt es sich um ventrikuläre Arrhythmien, bei denen sich von Schlag zu Schlag die QRS Achse um 180° ändert. Die untenstehende Abbildung 3 zeigt drei, zu verschiedenen Zeitpunkten abgeleitete Herzaktionen eines Patienten mit Langzeit-EKG.



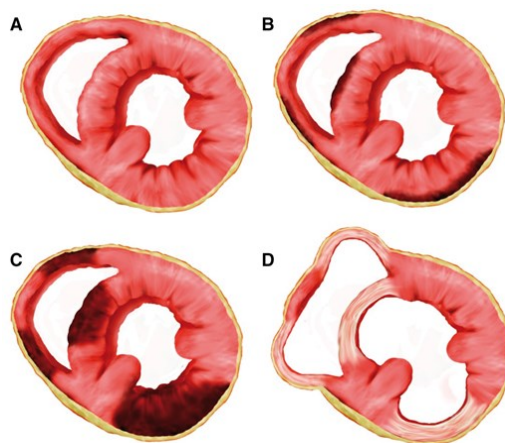
**Abbildung 3: Typische Bilder von ventrikulären Tachykardien (VT) eines Patienten mit CPVT (18)**

- (A)** Polymorphe ventrikuläre Tachykardie
- (B)** Bidirektionale ventrikuläre Tachykardie
- (C)** Schnelle polymorphe ventrikuläre Tachykardie, welche in Kammerflimmern übergeht.

## Arrhythmogene rechtsventrikuläre Kardiomyopathie

Die arrhythmogene rechtsventrikuläre Kardiomyopathie/-dysplasie, kurz ARVC/D, ist eine erbliche Erkrankung des Herzmuskels, bei welcher es zu einem Verlust von myokardialem Gewebe und Einlagerung von Binde- und Fettgewebe kommt (21). Betroffen ist vor allem der rechte Ventrikel, gelegentlich auftretende Manifestationen im linken Ventrikel werden als ALVC bezeichnet (7). Symptome der ARVC/D manifestieren sich meist zwischen der zweiten und fünften Lebensdekade und stellen sich als Schwindel, Palpitationen und Synkopen dar, welche durch ventrikuläre Tachykardien bedingt werden, sowie als plötzlicher Herztod, welcher fatalerweise bei 50% der Patienten das initiale Symptom darstellt (22, 23). Die Prävalenz der ARVC/D liegt bei etwa 1:2.000 (22).

ARVC/D-Patienten haben ein strukturell unauffälliges Herz bei der Geburt und entwickeln erst später die kardiomyopathischen Veränderungen, welche in Abbildung 4 dargestellt sind (21). So ist auch erst im fortgeschrittenen Stadium die Reduktion der rechtsventrikulären Pumpfunktion echokardiographisch darstellbar, jedoch kann es bereits vor Beginn einer Herzinsuffizienz zu bösartigen ventrikulären Herzrhythmusstörungen kommen und sogar zum plötzlichen Herztod (7). Das mittlere Alter der Betroffenen bei der Diagnosestellung liegt bei 31 Jahren (20). Die ARVC/D betrifft phänotypisch häufiger Männer (2-3:1) und ist für 22% der plötzlichen Herztode bei jungen Erwachsenen verantwortlich (23).



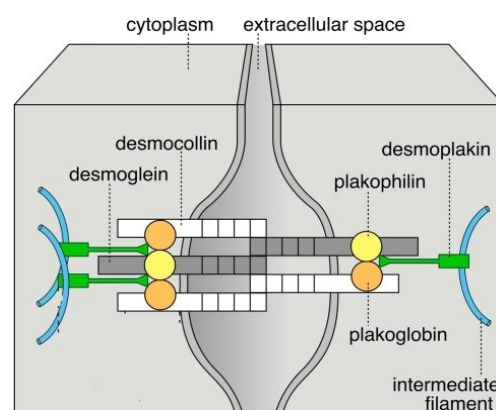
**Abbildung 4: Veränderung des Myokards im Krankheitsverlauf (22)**

- (A)** Bei der Geburt weisen die Patienten ein phänotypisch gesundes Herz auf.
- (B)** Frühe myokardiale Schädigungen beginnen epikardial und **(C)** breiten sich transmural aus.
- (D)** Anschließend wird die Herzwand dünner, es kommt zur Fibrozyten-Einlagerung und Aneurysmata-Entwicklung.

Die Diagnose der ARVC/D wird anhand der sog. *2010 Task Force Criteria* gestellt, welche charakteristische echokardiographische, arrhythmische, strukturelle und/oder histopathologische Abnormalitäten berücksichtigen. So ist beispielsweise eine im EKG auftretende Epsilon-Welle sowie bei rechts-präkordialer Ableitung eine invertierte T-Welle mit verbreitertem QRS-Komplex typisch und wird daher als sog. Major Kriterium eingestuft (24).

Mit der ARVC/D werden bisher 16 Gene assoziiert, jedoch finden sich bei nur etwa 60% der phänotypisch eindeutig erkrankten Patienten auch Mutationen in diesen (21). Die bisher identifizierten Gene kodieren für Proteine der Glanzstreifen, die Desmosomen, die neben mechanischer Stabilisierung auch für die elektrische Kopplung der Zellen verantwortlich sind. Durch Mutationen in den desmosomalen Genen wird die elektrische und mechanische Stabilität des ventrikulären Myokards beeinträchtigt: konsekutiv kommt es zur Inflammation, Apoptose und Bindegewebs-Infiltration, welche meist nach der Pubertät beginnt. Eine Minderheit der Patienten (37%) zeigt Mutationen in nicht-desmosomalen Genen (21, 23).

Kardiale Desmosomen setzen sich aus drei Hauptgruppen von Proteinen zusammen: den Transmembran-Proteinen, den sog. Cadherinen Desmocollin-2 (DSC2) und Desmoglein-2 (DSG2), dem Protein Desmoplakin (DSP) sowie den Verbindungs-Armadillo-Proteinen Plakoglobin (JUP) und Plakophilin-2 (PKP2). Die letzten Beiden sind Mediatoren zwischen den Cadherinen und dem Desmoplakin. Letzteres ist wiederum mit Intermediärfilamenten des zelleigenen Cytoskeletts verbunden. In Abbildung 5 ist der Aufbau eines Desmosoms dargestellt.



**Abbildung 5: Aufbau einer desmosomalen Zell-Zell-Verbindung (25)**

Etwa 80% der ARVC/D-Fälle zeigen Mutationen im PKP2-Gen (20-46%), DSP- (3-15%) und DSG2-Gen (3-20%). Die Krankheit wird in der Regel autosomal dominant vererbt (23). Zudem scheint es einen Gen-Dosis abhängigen Effekt zu geben: so sind Träger multipler Genmutationen einem erhöhten Risiko

für bösartige Kammertachykardien und für den plötzlichen Herztod ausgesetzt (22). Des Weiteren ist nachgewiesen, dass schwere oder besonders früh einsetzende Fälle durch *compound* heterozygote (zwei Allele für dasselbe Gen, die jeweils unterschiedliche Mutationen tragen) oder digene (Mutationen in zwei verschiedenen Genen) Mutationen verursacht werden (26). Ebenso scheinen epigenetische Faktoren und Umwelteinflüsse eine Rolle zu spielen, wie Studien mit monozygotischen Zwillingen nahelegten (23). Gleichzeitig muss aber erwähnt werden, dass sich mit der Erkrankung assoziierte Genvariationen in den oben genannten Genen zum Teil auch bei Gesunden zeigen, ohne dass diese phänotypisch erkranken (23).

### **Arrhythmogene unklassifizierte Kardiomyopathie (AUCM)**

Die in der Spezialambulanz des IfGH identifizierten AUCM-Patienten zeigten größtenteils eine Kardiomyopathie mit einem primär arrhythmogenen, zum Teil sehr malignen Verlauf (Kammerflimmern, SCD) und zwar der Großteil vor dem 40. Lebensjahr. Typischerweise manifestieren sich Kardiomyopathien erst nach dem 40. Lebensjahr, sodass bei dieser Kardiomyopathie-Form von einem besonders schnellen und aggressiven Verlauf ausgegangen werden muss.

In dem oben beschriebenen Kollektiv war die kardiovaskuläre Bildgebung nicht für eine bestimmte Kardiomyopathie wegweisend. Insgesamt fanden sich bei 61% der Patienten, bei welchen eine Bildgebung durchgeführt wurde, strukturelle Veränderungen des Herzens sowie zum Teil nach Biopsie-Entnahme Pathologien des Myokards. Insbesondere wurden Hypertrabekularisierungen sowie leichte Dilatationen der Ventrikel beschrieben. Keine der Befunde war jedoch ausreichend für die eindeutige Diagnose einer ARVC/D, DCM oder HCM.

Typisch waren außerdem Arrhythmien, welche vor allem als ventrikuläre Extrasystolen auftraten, oftmals heterogener Morphologie. Darüber hinaus fanden sich in EKG-Befunden supraventrikuläre Extrasystolen, AV-Blöcke sowie Salven. Diese traten überwiegend gleichermaßen in Ruhe sowie in Belastungssituationen auf, was eindeutig gegen eine CPVT sprach.

Zusammenfassend ließen sich die Krankheitsbilder nicht eindeutig einer der üblichen Kardiomyopathie-Formen (DCM, CPVT etc.) zuordnen. Die AUCM stellt somit einen neuen Phänotyp dar, der genetisch und klinisch noch unzureichend aufgeklärt ist. Sie ist am ehesten der arrhythmogenen Kardiomyopathie (ACM) zuzuordnen, welche nach der *Heart Rhythm Society* definiert ist als eine arrhythmogene Herzmuskelerkrankung, welche nicht ischämisch, hypertensiv oder valvulär bedingt ist, und sich klinisch durch Vorhofflimmern, Leitungsstörung oder ventrikuläre Arrhythmie darstellen kann (4). Ebenso finden sich bei der ACM, wie auch bei der AUCM, sowohl



phäno- als auch genotypisch häufig Überschneidungen zu weiteren Kardiomyopathie-Formen, insbesondere zu der dilatativen Kardiomyopathie (4).

Um herauszufinden, wie stark die AUCM durch eine genetische Komponente bedingt wird, sollten im Rahmen dieser Arbeit die Proben von 57 Patienten durch NGS sequenziert werden und somit die Kausalität der AUCM näher erforscht werden.

## **Problem der Probenvertauschung und *Next-Generation Sequencing***

Durch die genetische Analyse von kardiomyopathischen Genen konnte die Therapie herzkranker Patienten und deren Angehöriger in den letzten Jahren deutlich verbessert werden. Die Analyse erfolgt dabei in der Regel durch das sog. *Next-Generation Sequencing*, welches auch für die AUCM-Patienten eingesetzt wurde. Diese Nukleinsäuren-Sequenzierung ist eine Methode zur Determinierung der exakten Reihenfolge von Nukleotiden in einem DNA- oder RNA-Molekül (27). Nachdem bis vor einigen Jahren die sog. Sanger Sequenzierung (*„first generation sequencing“*), welche 1977 von Frederick Sanger etabliert wurde und auf dem Prinzip des Kettenabbruchs beruht, Goldstandard war, wird heute vor allem *„second generation“* bzw. *„next-generation sequencing“* (NGS) durchgeführt. NGS-Plattformen führen vielfach parallele Sequenzierungen durch, wodurch Millionen Fragmente von DNA-Proben gleichzeitig sequenziert werden können. Dies ermöglicht heutzutage die Sequenzierung eines gesamten Genoms in weniger als einem Tag – zum Vergleich: das *„Human Genome Project“* im Jahr 2001, welches mit der Sanger Sequenzierung erstmals das menschliche Genom entschlüsselte, dauerte etwa 13 Jahre (27, 28).

Gemeinsam ist allen NGS Plattformen die massive parallele Sequenzierung von klonal amplifizierten oder einzelnen DNA-Molekülen, die räumlich voneinander getrennt in einer Fließzelle gebunden sind (27). Die am häufigsten in der Forschung sowie in klinischen Laboren verwendeten Plattformen sind die *LifeTechnologies<sup>®</sup> Ion Torrent Personal Genome Machine* (PGM) und die *Illumina<sup>®</sup> MiSeq* (28). Letztere wurde auch im Rahmen dieser Arbeit eingesetzt. Die Lesegenauigkeit beträgt bei mehr als 90% der sequenzierten Basen  $>Q30^2$ , was bedeutet, dass die Genauigkeit der korrekten Basenbestimmung bei diesen Basen bei 99,9% liegt und nur 1 in 1000 Basen falsch bestimmt wird (29).

---

<sup>2</sup> Q30 ist ein Qualitätsscore, welcher sich aus den *„base calling error probabilities“* (P) berechnet (29).

Pro Run werden ca. 6 GB Sequenzendaten erstellt, wobei sich die Sequenzierungskosten pro GB auf etwa 200 US\$ belaufen. Jeder Sequenzierungslauf benötigt etwa 27 Stunden (30).

Problematisch dabei ist jedoch neben den noch relativ hohen Kosten außerdem, dass trotz aller Sorgfalt falsch positive sowie falsch negative Analyseergebnisse möglich sind, wodurch Patienten unnötig therapiert werden oder aber lebensrettende Therapien ausbleiben. Diese Analysefehler können durch Probenvertauschungen im Rahmen der Analysevorbereitungen bedingt sein. Die sog. *library preparation* als Vorbereitung der Proben für ein *Next-Generation Sequencing* ist hochgradig kompliziert und bietet zahlreiche Fehlermöglichkeiten.

Um Probenverwechslungen mit an Sicherheit grenzender Wahrscheinlichkeit ausschließen zu können, sollte eine Methode etabliert werden, mit welcher DNA-Proben in Bezug auf in Genen des Genpanels lokalisierten Basensubstitutionen, die in der allgemeinen Bevölkerung relativ häufig vorkommenden *single nucleotide substitutions* (SNPs), genotypisiert werden können, um nachfolgend den ermittelten Genotyp mit dem Ergebnis des NGS-Genotypes zu vergleichen. Hierfür wurde die *high resolution melting* PCR (HRM-PCR) ausgewählt.

Die *High-Resolution-Melt* (HRM) Analyse ist eine Methode, minimale Basenvariationen innerhalb von DNA-Sequenzen zu erkennen. Innerhalb einer Bevölkerung beobachtet man natürlich vorkommende Variationen in Bezug zur Referenzsequenz, die keine funktionelle Relevanz haben. Als solche *Single Nucleotide Polymorphisms* (SNPs) bezeichnet man dabei einzelne Basenveränderungen im Genom mit einer Allelfrequenz von mehr als 1% in der Vergleichspopulation.

Die HRM-Analyse basiert auf dem Dissoziationsverhalten von doppelsträngigen DNA-Molekülen (dsDNA). Mit steigender Temperatur trennen sich die Wasserstoffbrückenbindungen sowie alle weiteren Bindungen auf und die DNA trennt sich in zwei Einzelstränge, sie ‚schmilzt‘. Das Schmelzverhalten der dsDNA hängt dabei unter anderem von ihrem Gehalt an G und C Basen, so schmelzen AT-reiche Regionen schneller, sowie der Länge des DNA-Amplicons ab (31). Der Vorteil der HRM-PCR liegt darin, dass es sich um eine relativ simple und kostengünstige Methode handelt, durch welche dennoch Verwechslungen von Probenmaterial mit den oben genannten Konsequenzen sicher detektiert werden können. Weitere Details zur Methode der HRM-PCR finden sich in Kapitel 2.3.10.

Zusammengefasst wurde durch die oben erläuterte Methode des *Next-Generation Sequencing* nach einer kausalen Genmutation der AUCM gesucht und darüber hinaus die Methode der HRM-PCR dazu eingesetzt, ein Verfahren zu etablieren, welches schnell und einfach (durch die relativ simple Methode), aber dennoch sicher eine Probenverwechslung innerhalb der *library preparation* der NGS detektieren konnte.

## 1.3 Ziel der Arbeit

Die sogenannte arrhythmogene unklassifizierte Kardiomyopathie, kurz AUCM, stellt einen neuen klinischen Phänotyp einer Herzmuskelerkrankung dar, der genetisch und klinisch noch unzureichend aufgeklärt ist. In dieser Arbeit sollte geklärt werden, in wie weit die AUCM eine genetische Ätiologie hat und welche Gene für die Erkrankung kausal sind. Um diese Fragen zu klären, sollte unter Anwendung moderner DNA-Analysetechnologien (Multi-Gen-Panel-Sequenzierung; MGPS) eine ätiologische Ursachenfindung und Zuordnung bei AUCM-Patienten vorgenommen werden.

Darüber hinaus wurde mittels HRM-PCR-Technik eine Methode entwickelt, um prä-analytische Fehler der DNA-Bearbeitung (z.B. Probenvertauschung) sicher zu identifizieren. Durch diese sollte ein Vergleich der individuell unterschiedlichen Genvarianten, sogenannte SNPs, eines Patienten in einer unabhängigen zweiten Methode erfolgen. Mittels HRM-PCR sollte der Genotyp mehrerer SNPs, welche durch die *MiSeq*<sup>®</sup> abgedeckt waren, erneut identifiziert werden und mit dem Ergebnis der MGPS verglichen werden. Bei Übereinstimmung wäre somit eine korrekte Probenzuordnung gewährleistet, bei Divergenz eine Vertauschung bewiesen.

## 2. Material und Methodik

### 2.1 Verwendete Materialien

#### 2.1.1 Geräte

**Tabelle 1: verwendete Geräte mit Modell- und Herstellerbezeichnung**

Gerät	Modell	Hersteller
<i>Bioanalyzer</i>	Agilent <i>Bioanalyzer</i> <sup>®</sup> 2100	<i>Agilent Technologies</i> (Waldbronn, Deutschland (D))
<i>Chip Primer Station</i>		<i>Agilent</i> (Santa Clara, United States of America (USA))
DNA-Isolationsgerät	<i>QIACube</i> <sup>®</sup>	<i>Qiagen</i> (Hilden, D)
Elektrophorese Gerät	<i>QIAXcel Advanced System</i>	<i>Qiagen</i> (Hilden, D)
Eismaschine	Scotsman AF-10	<i>Scotsman Ice Systems</i> (Willston, USA)
Eindampfgerät	<i>Speed Vac</i> Konzentrator SPD111V – 230	<i>Thermo Quest</i> (Waltham, USA)
Fluorometer	<i>Qubit</i> <sup>®</sup> 2.0	<i>Invitrogen</i> (Carlsbad, USA)
Genetic Analyzer	ABI Prism <sup>®</sup> 3500xL (24 Kapillarer)	<i>Applied Biosystem</i> (Forster City, USA)
Handdispenser		<i>Eppendorf AG</i> (Hamburg, D)
Kühl- und Gefrierschränke	Verschiedene	<i>Bosch, Liebherr</i> (Stuttgart, D)
Magnetstand		<i>Invitrogen by ThermoFisher Scientific</i> (Carlsbad, USA)
Mehrkanalpipette	0,5-10 µl	<i>Eppendorf AG</i> (Hamburg, D)
Mikroliterpipetten	0,5-10 µl; 10-100µl, 100-1000 µl	<i>Eppendorf AG</i> (Hamburg, D)
Mikroplattenschüttler	MixMate Nr.1	<i>Eppendorf AG</i> (Hamburg, D)
<i>MiSeq</i> <sup>®</sup> Gerät	<i>MiSeq</i> <sup>®</sup> 2	<i>Illumina</i> (Essex, United Kingdom (UK))
<i>NanoDrop</i> <sup>®</sup> Spektrophotometer	ND-1000	<i>Peqlab</i> (Erlangen, D)
Pipettierrobotor	<i>Tecan EVO 100</i>	<i>Tecan Group Ltd.</i> (Männedorf, Schweiz (CH))
<i>Real Time-PCR Cycler</i>	<i>Rotor-Gene</i> <sup>®</sup> Q	<i>Qiagen</i> (Hilden, D)
Reinstwasseranlage	Milli-Q	<i>Millipore</i> (Schwallbach, D)
<i>Thermocycler</i>	<i>Primus 96 well High</i>	<i>MWG-Biotech AG</i> (Ebersberg, D)
Tischzentrifuge	<i>PerfectSpin Mini</i>	<i>PeqLab</i> (Erlangen, D)

Spektrophotometer	<i>QIAxpert</i>	<i>Qiagen</i> (Hilden, D)
Vortex-Mischer	Vortex Genie 2 (G560E)	<i>Scientific Industries</i> (Bohemia, USA)
Vortex-Mischer für <i>Bioanalyzer-Chip</i>	<i>Agilent Bioanalyzer</i> Vortexer	<i>Agilent</i> (Santa Clara, USA)
Zentrifuge	Eppendorf Zentrifuge 5804 R	<i>Eppendorf AG</i> (Hamburg, D)
Zentrifuge	Biofuge pico	<i>Heraeus</i> (Hanau, D)
Zentrifuge	Eppendorf Zentrifuge 5415 C	<i>Eppendorf AG</i> (Hamburg, D)

## 2.1.2 Chemikalien und Kits

**Tabelle 2: verwendete Chemikalien und Kits mit Herstellerbezeichnung**

<b>Chemikalien</b>	<b>Hersteller</b>
1 M NaOH	<i>AppliChem</i> (Darmstadt, D)
10 mM TrisHCl (ph 8,5)	<i>AppliChem</i> (Darmstadt, D)
<i>Agilent High Sensitivity DNA Kit</i>	<i>Agilent Technologies</i> (Waldbronn, D)
<i>BigDye<sup>®</sup> Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit</i>	<i>ThermoFisher Scientific</i> (Carlsbad, USA)
<i>BigDye<sup>®</sup> Xterminator™ Purification Kit</i>	<i>ThermoFisher Scientific</i> (Carlsbad, USA)
<i>peqGOLD dNTP Set 4x25µmol</i>	<i>Peqlab Biotechnologie GmbH</i> (Erlangen, D)
Ethanol 100%	<i>Carl Roth GmbH &amp; Co</i> (Karlsruhe, D)
<i>ExoSAP-It Enzym</i>	<i>Affymetrix, ThermoFisher Scientific</i> (Carlsbad, USA)
<i>GeneRead Library Quant Kit</i>	<i>Qiagen</i> (Hilden, D)
<i>HotStarTaq DNA Polymerase Kit</i>	<i>Qiagen</i> (Hilden, D)
Incidin <sup>R</sup> Plus	<i>AppliChem</i> (Darmstadt, D)
PBS Puffer	<i>Sigma Aldrich</i> (St.Louis, USA)
TRIS	<i>Carl Roth</i> (Karlsruhe, D)
<i>TruSight Cardio Sequencing Kit for MiSeq and MiSeqDx</i>	<i>Illumina</i> (Essex, UK)
Tween 20	<i>Promega</i> (Madison, USA)
<i>Type-it HRM PCR Kit</i>	<i>Qiagen</i> (Hilden, D)
<i>QIAamp<sup>®</sup> DNA Blood Mini Kit</i>	<i>Qiagen</i> (Hilden, D)
<i>QIAxcel DNA Screening Kit</i>	<i>Qiagen</i> (Hilden, D)
<i>Qubit dsDNA HS Assay Kit</i>	<i>ThermoFisher Scientific</i> (Carlsbad, USA)

### 2.1.3 Software

**Tabelle 3: verwendete Software mit Herstellerbezeichnung**

Artikel	Hersteller
<i>2100 Expert Software</i>	<i>Agilent Technologies</i> (Waldbronn, D)
<i>Alamut<sup>®</sup> 2.3.2</i>	<i>Interactivte Biosoftware</i> (Rouen, F)
<i>Citavi 6.3</i>	<i>Swiss Academic Software</i> (Wädenswil, CH)
<i>GenSearch 4.3</i>	<i>PhenoSystems</i> (Bois de Villers, Belgien)
<i>Illumina Variant Studio v3.0</i>	<i>Illumina</i> (San Diego, USA)
<i>Microsoft Office (Word, Excel, Access)</i>	<i>Microsoft</i> (Redmond, USA)
<i>ND-1000 V.3.3.0</i>	<i>Peqlab</i> (Erlangen, D)
<i>Primer Blast</i>	<i>Primer Blast NCBI</i> (Bethesda, USA)
<i>Rotor-Gene Q Series Software 2.3.1.49</i> <i>Rotor-Gene ScreenClust (HRM Software)</i>	<i>Qiagen</i> (Hilden, D)
<i>Thermocycler Primus 96 well High Pressure Lid Block</i>	<i>MWG-Biotech AG</i> (Ebersberg, D)
<i>Windows 10</i>	<i>Microsoft</i> (Redmond, USA)

### 2.1.4 Verbrauchsmaterialien

**Tabelle 4: verwendete Verbrauchsmaterialien mit Herstellerangabe**

Artikel	Hersteller
1,5 ml Probenröhrchen	<i>Biozym Scientific GmbH</i> (Hess. Oldendorf, D)
2 ml Reaktionsgefäße	<i>Eppendorf AG</i> (Hamburg, D)
4 ml Reaktionsgefäße	<i>Eppendorf AG</i> (Hamburg, D)
<i>8er Flat-Cap-Stripes</i>	<i>Peqlab</i> (Erlangen, D)
<i>8er Strip Tubes</i>	<i>Peqlab</i> (Erlangen, D)
30 ml Reagenzflaschen für den <i>QIAcube<sup>®</sup></i>	<i>Qiagen</i> (Hilden, D)
96-Well MIDI Platte	<i>Eppendorf AG</i> (Hamburg, D)
96-Well-MultiPLY-PCR-Platte	<i>Sarstedt</i> (Nürnbrecht, D)
96-Well-Standard-Microplatte	<i>ABgene</i> , (Hamburg, D)
<i>Filter Tips 8x128 (1000 µl) und 8x128 (200 µl) für den QIAcube</i>	<i>Qiagen</i> (Hilden, D)

<i>High Sensitivity DNA Chips</i>	<i>Agilent Technologies</i> (Waldbronn, D)
Messpipette, 5ml	<i>Eppendorf AG</i> (Hamburg, D)
<i>Microseal film</i> (Abdichtfolie)	<i>Bio Rad</i> (Hercules, USA)
PCR-Klebefolie	<i>Alu ABgene</i> (Hamburg, D)
<i>RotorGene tubes</i> (0,1 ml)	<i>Qiagen</i> (Hilden, D)
<i>Soft-Tubes</i> für PCR (0,2 ml)	<i>Biozym Scientific GmbH</i> (Hess. Oldendorf, D)
Standard Reaktionsgefäße (1,5 ml)	<i>Eppendorf AG</i> (Hamburg, D)
Schraubverschlüsse mit Dichtring	<i>Biozym Scientific GmbH</i> (Hess. Oldendorf, D)
<i>Twin.tec 96 well PCR Platten</i>	<i>Eppendorf AG</i> (Hamburg, D)

## 2.2 Patientenkollektiv

Im Rahmen dieser Arbeit wurden 14 Patienten mit der Diagnose einer arrhythmogenen unklassifizierten Kardiomyopathie (AUCM) molekulargenetisch auf Veränderungen in 174 Genen untersucht. Bei allen 14 Patienten war die molekulargenetische Ursache ihrer kardialen Erkrankungen bisher unbekannt und der gesamte Analyse-Workflow, von der Probenpräparation bis zur Auswertung der genetischen Daten, wurde eigenständig unter Anleitung durchgeführt. Weitere 43 Patienten mit der Diagnose einer AUCM waren bereits vor dieser Arbeit im Rahmen einer Panel-basierten Gendiagnostik untersucht worden und die genetischen Befunde dieser Patienten wurden im Rahmen dieser Arbeit lediglich in die statistische Auswertung in Bezug auf die Sensitivität der Gene für die Erkrankung einbezogen. Die für die Analysen benötigten Blut- und Leukozytenproben sowie die Patientendaten entstammten aus der Patientenprobenbank des IfGH. Zuvor hatten alle untersuchten Patienten eine Einverständniserklärung unterschrieben, dass ihre Proben zu Forschungszwecken verwendet werden dürfen.

Das gesamte Patientenkollektiv umfasst Proben von 42 Frauen und 15 Männer, was einem Verhältnis von 1,6:1 entspricht. Das mittlere Alter aller in die Analysen eingeschlossenen Patienten betrug 38,51 Jahre bei Diagnosestellung. Die Altersspanne bei Diagnosestellung reichte dabei von 17 bis 73 Jahren. Bei allen Patienten bestand eine kardiale Symptomatik mit teils arrhythmischem, teils kardiomyopathischem Schwerpunkt. Die Diagnose der arrhythmogenen unklassifizierten Kardiomyopathie wurde überwiegend von Kardiologen des Universitätsklinikums Münster gestellt.

Im Anhang finden sich unter *Anamnese der Patienten* auf Seite I sowie in Tabelle 27 eine Auflistung der eigenständig sequenzierten Patienten mit einer kurzen Zusammenfassung ihrer Krankengeschichte sowie die gefundene Genmutation.

## 2.3 Methodik

### 2.3.1 Next-Generation Sequencing (NGS)

Die Methode des NGS ist in der Einleitung vorgestellt. Für die Sequenzierung wurde das ‚*TruSight Cardio Panel*‘ von *Illumina*<sup>®</sup> eingesetzt, welches 174 Gene umfasst, die mit 17 verschiedenen kardialen Erkrankungen assoziiert sind. Die kumulative Länge aller *Targets* beträgt 572 kb bei insgesamt 3250 *Targets*. In die Auswertung wurden nur Exone oder Genabschnitte integriert, deren Sequenz mit mindestens 20 Sequenzen abgedeckt war (*coverage* = min. 20x). Eine inadäquat niedrige *Coverage* kann ggf. dazu führen, dass vorliegende Nukleotid-Varianten nicht detektiert werden, was zu falsch negativen Ergebnissen insbesondere bei heterozygoten Patienten führen kann (27). Der Ablauf einer NGS ist vereinfacht in Abb. 6 dargestellt. Die Arbeitsschritte unterteilen sich in (1) Probengewinnung und DNA-Isolation, (2) *library* Präparation, (3) Amplifizierung der DNA, (4) Sequenzierung und (5) Datenanalyse mit *Alignment* und *Basecalling*.

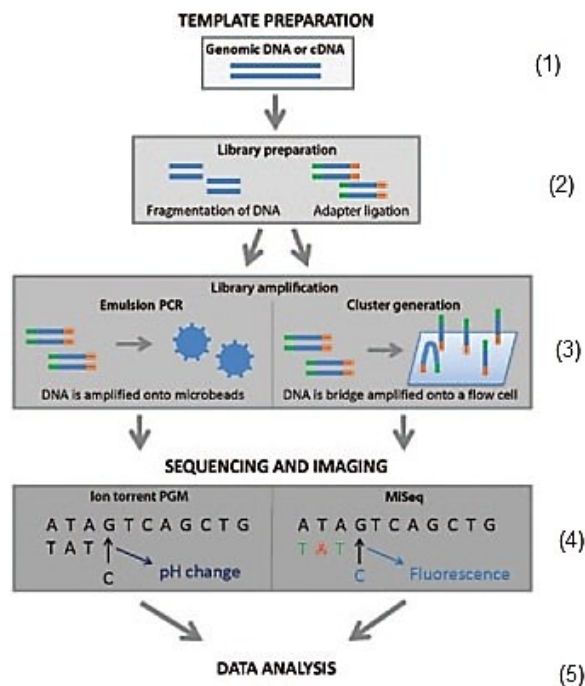


Abbildung 6: Ablauf einer NGS (28)

Bevor es zur eigentlichen Sequenzierung kommen kann, ist eine aufwendige Vorbereitung der DNA-Proben notwendig. Diese sog. *library preparation* nimmt zeitlich den größten Teil des NGS ein und ist in Kapitel 2.3.3 ausführlich beschrieben. Anschließend erfolgt, bereits im *MiSeq*<sup>®</sup> Gerät, die *cluster generation*, bei welcher die zuvor tagmentierte DNA an eine *Flow Cell* im Gerät gebunden wird. Diese



optisch-transparente Fließzelle hat auf ihrer Oberfläche Oligonukleotid-Anker gebunden. Die tagmentierte DNA wurde während der *library* Präparation ‚*end-repaired*‘, wodurch 5′-phosphorylierte stumpfe Enden entstanden. Nun wird durch die Polymerase-Aktivität des Klenow-Fragments<sup>3</sup> eine einzelne Adenin-Base zum 3′-Ende des stumpfen phosphorylierten DNA-Fragmentes hinzugefügt. Dadurch kann das DNA-Fragment an den Oligonucleotid-Adapter binden, welcher einen Überhang einer einzelnen Thymin-Base an seinem 3′-Ende aufweist. Diese Adapter sind komplementär zu den *Flow Cell*-Ankern, wodurch die tagmentierte, einzelsträngige DNA, gekoppelt an die Adapter, an die *Flow Cell* binden kann. Nachfolgend erfolgt durch 3′-Extension einer Polymerase ein dsDNA-Doppelstrang.

Das doppelsträngige DNA-Fragment wird denaturiert und das Originaltemplate verdaut, wohingegen der neusynthetisierte, *reverse* 3′-5′-Strang an der *Flowcell* gebunden bleibt. Das 5′-Ende dieses Einzelstranges bindet dann bogenförmig an eine kovalent gebundene Erkennungssequenz, woraufhin durch 3′-Extension ein Doppelstrang entsteht. Dies bezeichnet man als *Bridge Amplification*, welche in Abb. 7 dargestellt ist. Das dsDNA-Fragment wird erneut denaturiert und das *reverse*-Template verdaut, wobei wieder die 3′-Ende der Fragmente an den Erkennungssequenzen auf der *Flowcell* gebunden bleiben. Diese *Bridge Amplification* wird mehrfach wiederholt.

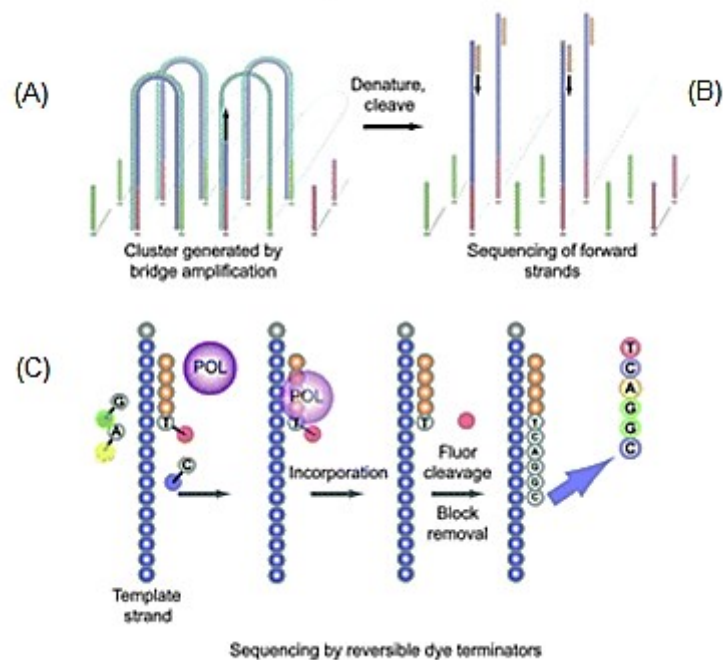
Anschließend werden die revers-komplementären Stränge abgeschnitten, wodurch ein *Cluster* von multiplen, kongruenten DNA-Strängen in identischer Orientierung entsteht. Nun binden Sequenzprimer spezifisch an die Adaptersequenzen auf den *forward*-DNA Strängen. Es folgt das Prinzip des ‚*Sequencing by Synthesis*‘: In den nachfolgenden 151 Zyklen werden in jedem neuen Zyklus fluoreszierende Nucleotidtriphosphate und Polymerasen zugesetzt, wobei die freigesetzte Fluoreszenz eines eingebauten Nucleotids jeweils photographisch festgehalten wird (33). Ab dem Zyklus 152 erfolgt zusätzlich die Sequenzierung des Gegenstrangs (sog. *paired-end technology*).

Ein *paired-end* 150-Zyklus Lauf besteht aus zwei 151-Zyklus Auslesungen, also insgesamt 302 Zyklen, wovon am Ende eines Laufes nur 2x 150 Zyklen analysiert werden (34). Der ‚*Extra*‘-Zyklus wird für die Datenabstimmungsprozesse benötigt. In jedem der 302 Zyklen wird jeweils nur eine Base integriert, was durch reversible Terminatoren an jedem Nucleotid gewährleistet wird. Da bei dem Einbau der vier NTP jeweils eine individuelle Farbe emittiert wird, kann anhand der freiwerdenden Fluoreszenz die eingesetzte Base und somit die Basenabfolge des DNA Fragments ermittelt werden (27).

---

<sup>3</sup> Das *Klenow* Fragment ist das größere der beiden Proteinfragmente der DNA-Polymerase I aus *Escheria coli* (32)

Dieses Verfahren ist in Abbildung 7 vereinfacht dargestellt: (A) Zunächst erfolgt die Bridge Amplifikation, durch welche brückenförmig-gebogene Doppelstränge entstehen. (B) Nach Denaturierung und Verdau der *reverse*-Stränge, werden nun ausschließlich die *forward*-Stränge sequenziert. (C) Dies geschieht durch eine Polymerase, welche fluoreszierende Nucleotide einbaut, wobei eine spezifische Fluoreszenz emittiert wird.



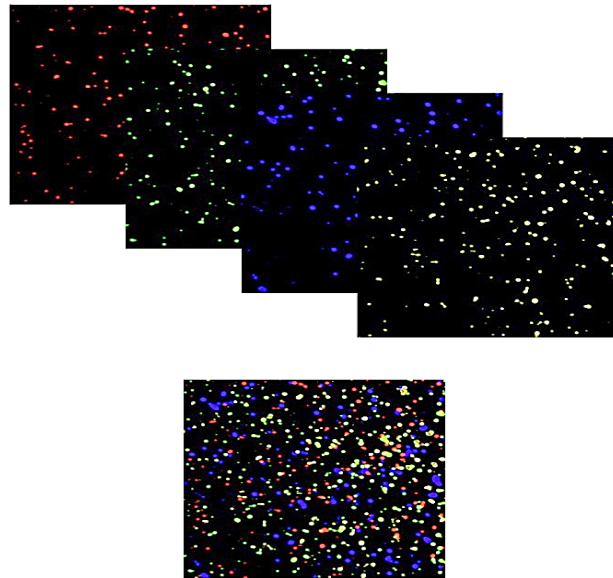
**Abbildung 7: Sequenzierungsablauf (27)**

Das Übersetzen der farbigen Bilddaten in Sequenzdaten bezeichnet man als *base calling*. Bildparameter wie Farbtintensität, Hintergrundaktivität und Störfarben werden durch einen plattform-internen Algorithmus ausgewertet und daraus Nucleotidsequenzen sowie fehlerwahrscheinlichkeits-abhängige Qualitätsscores für jede Base generiert. Dazu zählt auch der oben schon erwähnte Q-Score. Dieser berechnet sich durch folgende Formel:

$$q = -10 \times \log_{10}(e)$$

Dabei bezeichnet  $e$  die erwartete Wahrscheinlichkeit einer inkorrekten Basendetektierung. Durch das Logarithmieren ergibt sich aus der Fehlerwahrscheinlichkeit von 0,001 (0,1%) ein Wert von 30, wie er auch beim Illumina *MiSeq*® Gerät angegeben wird (27). Das bedeutet, dass nur 1 von 1000 Basen falsch bestimmt wird und die Exaktheit der Sequenzdaten somit bei 99,9% liegt.

In Abbildung 8 ist die emittierte Fluoreszenz dargestellt, wie sie bei Blick auf die *Flow Cell* erscheint. Jeder Farbpunkt stellt dabei den Einbau einer Base an einem DNA-Strang dar. Die oberen vier Bilder zeigen jeweils einzeln die vier basenspezifischen Farben, im unteren Bild sind diese übereinandergelegt. Aus diesen Daten ermittelt das *MiSeq*<sup>®</sup> Gerät dann, wie oben beschrieben, durch das *base calling* die Nukleotidabfolge.



**Abbildung 8: Darstellung der emittierten Fluoreszenz (27)**

### **2.3.2 DNA-Konzentrationsbestimmung und -Quantifizierung**

Die Konzentration der neu gewonnenen bzw. aufgetauten DNA wurde mithilfe des *Qubit*<sup>®</sup>-Gerätes bestimmt. Dieses ist ein Fluorometer, welches die in der Probe vorhandene DNA-Menge durch Messung der Absorption eines dsDNA-bindenden Farbstoffes bestimmen kann, ohne dass RNA oder Proteine die Werte verfälschen. Pro Messung sind nur 2 µl der DNA notwendig, welche mit einer *Working Solution*, die den fluoreszierenden Farbstoff enthält, versetzt wird.

Für die Messung wurden die *Qubit*<sup>®</sup> Reagenzien 30 min auf Raumtemperatur (RT) gebracht und anschließend eine *Working Solution* aus je 199 µl *Qubit*<sup>®</sup> dsDNA HS Buffer und 1 µl *Qubit*<sup>®</sup> dsDNA HS Reagenz angesetzt. Diese wurde auf die *Qubit*<sup>®</sup> Assay Tubes verteilt, wobei in jedes Tube 198 µl *Working Solution* und 2 µl DNA pipettiert wurden. Nach einer Inkubationszeit von 3 min wurde die Konzentration dreifach ermittelt und der Mittelwert bestimmt. Nachfolgend wurden die DNA-Proben ausgehend von der ermittelten Konzentration mit Tris-HCl auf 10 ng/µl eingestellt. Nach einer erneuten Konzentrationsmessung am *Qubit*<sup>®</sup> erfolgt die Einstellung auf eine Konzentration von 5,5 ng/µl, ebenfalls mit Tris-HCl. Schlussendlich wurde je 50 ng DNA für die *library* Präparation eingesetzt.

### 2.3.3 *library* Präparation

Für das *Next-Generation Sequencing* mit dem *MiSeq*<sup>®</sup> Gerät musste die Proben-DNA der zu untersuchenden Patienten zunächst in einem aufwendigen Prozess auf die Analyse vorbereitet werden. Diese sogenannte *library* Präparation erfolgte über mehrere Tage zusammen mit einer technischen Assistentin des IfGH. Eine *NGS library* umfasste dabei zehn Patienten-Proben.

#### Tagmentierung der genomischen DNA

Der erste Schritt zur Aufbereitung der Patienten-DNA war die Tagmentierung, das heißt die Fragmentierung und die Adapter-Ligation an die Proben. Dazu wurden der ‚*Tagment DNA Buffer*‘ (TD), die ‚*Tagment DNA Enzyme*‘ (TDE1) und die genomische DNA auf Eis aufgetaut sowie kurz anzentrifugiert. Ebenso mussten die ‚*Sample Purification Beads*‘ (SPB) und der ‚*Stop Tagment Buffer*‘ (ST) in mindestens 30 min auf Raumtemperatur gebracht werden. Ebenso wurde der ‚*Resuspension Puffer*‘ (RSB) aufgetaut.

Danach wurde in einem 8er PCR-Streifen je 10 µl genomischer DNA (5,0 ng/µl) pipettiert und zusätzlich 25 µl TD Puffer und 15 µl TDE1 hinzugegeben. Der Reaktionsansatz wurde durch zehnmaliges Auf- und Abpipettieren gemischt, für eine Minute bei 1800 rpm in einem Mikroplattenschüttler geschüttelt und für eine Minute bei 280 g und 20 °C zentrifugiert. Im Anschluss daran erfolgte eine Inkubation im *Cycler* für 10 min bei 58 °C (*Hold* at 10 °C). Zu den Proben wurden dann je 15 µl ST Puffer gegeben, um die Tagmentierung zu stoppen. Der Reaktionsansatz wurden durch Auf- und Abpipettieren gemischt und für eine Minute bei 1800 rpm in einem Mikroplattenschüttler geschüttelt. Letztlich erfolgte eine weitere Zentrifugation bei 280 g und 20 °C für eine Minute sowie eine Inkubation bei Raumtemperatur für 5 min. Nach dieser Prozedur lag die genomische Patienten-DNA tagmentiert vor.

#### Aufreinigung der tagmentierten DNA

Der gesamte Reaktionsansatz von je 65 µl pro Well wurde in eine 96 Well *MIDI* Platte überführt. Zu jedem gefüllten Well wurden 65 µl suspendierte ‚*Sample Purification Beads*‘ (SPB) hinzugegeben und durch Auf- und Abpipettieren gemischt. Nun wurde die *MIDI* Platte mit einer Klebefolie verschlossen und für 1 min bei 1800 rpm in einem Mikroplatten Schüttler geschüttelt. Anschließend wurde der Ansatz für 10 min bei RT inkubiert und dann für eine Minute bei 280 g und 20 °C zentrifugiert. Danach stellte man die Platte für 2 min auf den Magnetstand, durch welchen die magnetischen *Beads*, welche die Nukleinsäuren gebunden hatten, an eine Seite der Wells gezogen wurden. Der Überstand in den Wells wurde abgenommen und verworfen. Nun wurden 200 µl zuvor frisch angesetzten 80%igen

Ethanol langsam hinzugegeben und für 30 s inkubiert. Nach Ablauf dieser wurde das Ethanol abgenommen und verworfen. Das Waschen mit Ethanol wurde auf dieselbe Art wiederholt.

Während die Platte auf dem Magnetstand stand, wurden die *Magnetic Beads* für 10 min getrocknet, bis kein Ethanol mehr verblieben war. Durch diesen Vorgang war die tagmentierte DNA an die *Beads* gebunden sowie durch die Waschung mit Ethanol aufgereinigt worden.

Nun wurde die Platte vom Magnetstand heruntergestellt und je Reaktionsansatz 22,5 µl RSB hinzugefügt. Die Platte wurde erneut mit einer Folie verschlossen und für 1 min bei 1800 rpm in einem Mikroplatten Schüttler geschüttelt. Der Reaktionsansatz wurde durch zehnmaliges Auf- und Abpipettieren gemischt und dann für 2 min bei RT inkubiert sowie anschließend für 1 min bei 280 g und 20 °C zentrifugiert. Danach wurde die Platte für weitere 3 min auf den Magnetstand gestellt. Nach Ablauf dieser wurden 20 µl des Überstandes, welcher die gelöste, tagmentierte DNA enthielt, in einen 8er PCR-Streifen überführt.

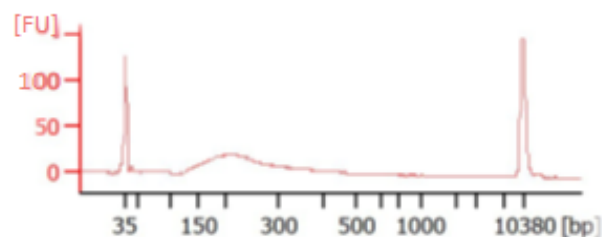
Zur Überprüfung der erfolgreichen Fragmentierung erfolgte eine Kontrolle mit dem *Agilent BioAnalyzer*<sup>®</sup>, wozu 1 µl des restlichen Überstandes verwendet wurden.

## **Elektrophoretische Auftrennung der DNA-Fragmente mit dem *Agilent 2100 BioAnalyzer*<sup>®</sup>**

Mit dem *BioAnalyzer*<sup>®</sup> werden die Größe von den DNA-Fragmenten bestimmt und überprüft, ob die zuvor stattgefundenene Fragmentierung erfolgreich war. Das Messprinzip des Gerätes beruht dabei auf herkömmlichen Gelelektrophorese-Verfahren, transferiert in ein Mikro-Chip-Format. Wird der beladene Chip in den *BioAnalyzer*<sup>®</sup> eingelegt, trennen sich die negativ geladenen DNA-Fragmente sowie die Kontroll-DNA-Leiter entsprechend ihrer Größe im elektrischen Feld des Gels auf. Die Detektion der DNA-Fragmente beruht auf Laser-induzierter Fluoreszenz-Detektion (LIF), bei welcher Färbemoleküle mit DNA-Strängen interkalieren und so eine Detektion ermöglichen. Die DNA-Leiter enthält Fragmente bekannter Größe und erlaubt somit die Auftragung einer Standardkurve der Laufweite gegen die DNA-Größe. Aufgrund des spezifischen Laufverhaltens der DNA-Fragmente kann daher ihre Größe bestimmt und die Fragmentierung überprüft werden (35).

Für die Analyse wurde zunächst der *Gel Dye Master Mix* vorbereitet: 15 µl *High Sensitivity Dye Concentrate* wurden zu der *High Sensitivity Gel Matrix* gegeben, gründlich gevortext, abzentrifugiert und auf den Spin Filter überführt. Dieser musste nun bei 2240 g für 10 min zentrifugiert werden. In der Zwischenzeit wurden die Elektroden des *BioAnalyzers*<sup>®</sup> mit dem *Elektroden Cleaner Ship*, welcher

destilliertes Wasser enthielt, gesäubert. Nun wurde ein *High Sensitivity DNA Chip* in die *Chip Priming Station* eingespannt und das mit **(G)** markierte Well wurde mit 9 µl *Gel-Dye Mix* beladen. Anschließend wurden die anderen mit G markierten Wells beladen sowie in das Well „Leiter“ und in alle *Sample Wells* 5 µl *Marker* pipettiert. Nun wurden je 1 µl *Sample* (=DNA) in 10 *Sample Wells* und 1 µl *Marker* in das 11. *Sample Well* pipettiert. Der Chip wurde für eine Minute bei 2400 rpm gevortext und anschließend in den *BioAnalyzer*® gelegt. Ein beispielhaftes Ergebnis dieser Kontrolle ist in *Abbildung 9* zu sehen. Bei optimaler Tagmentierung sollte die durchschnittliche Fragmentgröße bei ca. 150 bp liegen. Die Spitzen rechts und links entstehen durch die Zugabe des *Markers*.



**Abbildung 9: Ergebnis der Analyse der Probe ,12644-1 ‘ im Agilent BioAnalyzer®**

[FU] = Fluoreszenz; [bp] = Basenpaare

## Erste PCR-Amplifikation und PCR-Aufreinigung

Der *PCR-MasterMix ,Nextera library Amplification Mix‘* (NLM) wurde auf Eis sowie die *Index1-* und der *Index2-Primer* bei RT aufgetaut und anschließend für 5 s bei 600 g an zentrifugiert. Zu jedem Well des 8er *PCR-Streifen* mit der tagmentierten DNA wurden 20 µl NLM, 5 µl jeweils verschiedene *Index1 Primer* (i7 701-710) und 5 µl *Index2 Primer* (i5 505 (CSO 501/502)) zugesetzt. Durch die neun verschiedenen *Index1-Primer* erhält jede der Proben eine individuelle Markierung, wodurch auch nach *Probenvermischung* eine spätere *Identifizierung* der DNA möglich ist („*Multiplexen*“). Der genaue *Reaktionsansatz* ist in *Tabelle 5* nachzulesen.

**Tabelle 5: Ansatz der Primer im Well**

Nummer	FID	Index-Primer 1	Index-Primer 2
1	11129-3	i7 701	i5 505
2	12083-1	i7 702	i5 505
3	12254-1	i7 703	i5 505
4	12343-1	i7 704	i5 505

5	12336-1	i7 705	i5 505
6	12314-1	i7 706	i5 505
7	12260-1	i7 707	i5 505
8	12124-1	i7 708	i5 505
9	12644-1	i7 709	i5 505
10	10915-3	i7 710	i5 505

Anschließend wurden die Proben durch zehnmaliges Auf- und Abpipettieren gemischt und für eine Minute bei 1200 rpm in einem Mikroplatten Schüttler geschüttelt. Im Anschluss daran erfolgte eine einminütige Zentrifugation bei 280 g und 20 °C und eine Inkubation im *Cycler* mit dem Programm ‚NLA-PCR‘, welches in Tabelle 6 beschrieben ist.

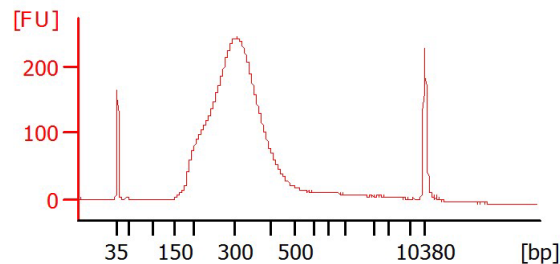
**Tabelle 6: Thermocyclerprogramm (NLA-PCR)**

Schritt	Temperatur (°C)	Zeit
Aktivierung der Primer	72	3 min
Inkubation	98	30 s
PCR Zyklus (wiederholt sich 10 Mal)	98	10 s
	60	30 s
	72	30 s
<i>Finale Elongation</i>	72	5 min
<i>Hold</i>	10	

Für die erste PCR-Aufreinigung wurde der NLA-Streifen mit den Proben für 1 min bei 280 g und 20 °C zentrifugiert. Anschließend wurden 50 µl aus jedem Well in eine MIDI Platte überführt und jeweils mit 90 µl zuvor gevortexten ‚*Sample Purification Beads*‘ vermischt. Die Ansätze wurden dann durch Auf- und Abpipettieren gemischt und für 1 min auf einem Mikroplattenschüttler geschüttelt. Nachfolgend wurde die Platte für 10 Minuten bei RT inkubiert sowie für 1 min bei 280 g und 20 °C zentrifugiert. Dadurch binden sämtliche Desoxynukleotide an die *Beads*, wodurch eine Reinigung der PCR-Produkte erzielt wird. Die Platte wurde dann für 3 min auf einen Magnetstand gestellt. Der Überstand wurde abgenommen und es wurden je 200 µl frisch angesetzten, 80%igen Ethanol hinzugegeben. Nach 30 s Inkubation wurde dieser wieder abgenommen. Das Waschen mit Ethanol wurde nochmals auf dieselbe Weise wiederholt. Nachdem die Platte von dem Magnetstand heruntergenommen wurde, wurden zu jedem Ansatz je 27 µl *RSB* pipettiert. Anschließend wurde die Platte für eine Minute bei 1800 rpm in

einem Mikroplatten Schüttler geschüttelt, die Ansätze durch zehnmaliges Auf- und Abpipettieren gemischt und für 3 Minuten bei RT inkubiert. Durch diese Prozedur lösten die Nukleinsäuren sich wieder von den *Beads*. Nach einer einminütigen Zentrifugation bei 280 g und 20 °C wurde die Platte erneut auf einen Magnetstand gestellt. Im Folgenden wurden je 25 µl des Überstandes in jedem Well in einen 8er Streifen überführt.

Zur erneuten Quantifizierung der *library* erfolgt eine Messung im *Qubit*<sup>®</sup>. Dazu wurden je 2 µl von den 3:1 mit *RSB* Puffer verdünnten Proben mit 198 µl *Qubit*<sup>®</sup> Lösung verdünnt und vermessen. Dabei lagen Ergebnisse zwischen 29,41 ng/µl und 59,9 ng/µl vor. Ebenso erfolgte eine Überprüfung der Fragmentgröße im *Agilent Bioanalyzer*<sup>®</sup>. Dafür wurden, nach dem oben beschriebenen Verfahren, je 1 µl von 1:10 mit *RSB Puffer* verdünnten *Samples* analysiert. In Abb. 10 ist ein beispielhaftes Ergebnis einer Probe dargestellt. Die DNA- Konzentration ist dort, im Vergleich zu Abbildung 9, deutlich höher.



**Abbildung 10: Beispielhaftes Ergebnis der Analyse der Probe 11129-3 im Agilent BioAnalyzer<sup>®</sup>**

[FU] = Fluoreszenz; [bp] = Basenpaare

## Poolen von mehreren DNA-Proben in einer *library*

Pro *library* sollen 750 ng DNA eingesetzt werden mit einem Gesamtvolumen von 40 µl. Sofern das Volumen größer als 40 µl ist, muss der Ansatz mit einer *Speed-Vac*<sup>®</sup> konzentriert werden. Eine *Speed-Vac*<sup>®</sup> ist eine beheizbare Tischzentrifuge, welche ein Vakuum erzeugen kann, durch das der Siedepunkt des Lösungsmittels (hier v.a. Tris-HCl) herabgesetzt wird. Damit nicht DNA-Moleküle durch austretende Gasblasen in dem Gerät verteilt werden, zentrifugiert das Gerät parallel die Lösung, sodass ein Schäumen der Lösung verhindert wird (36). Da das Gesamtvolumen der *gepoolten library* 149,5 µl betrug, wurde der Ansatz für 40 min im *Speed-Vac*<sup>®</sup> konzentriert. Schließlich lagen 30 µl DNA-*library* vor, welche mit 10 µl *RSB* Puffer auf 40 µl aufgefüllt wurden.



## Hybridisierung, Waschen und Aufreinigung

Zunächst wurden die ‚*TruSight Cardio Oligos*‘ (TCO) und der ‚*Enrichment Hybridization Buffer*‘ (EHB) bei RT aufgetaut. Bei den TCO handelt es sich um biotinylierte DNA-Oligo-Sonden, die an die ‚*region of interest*‘ binden. Nun wurden 40 µl der zuvor konzentrierten *library* mit 50 µl EHB und 10 µl TCO in eine *twin.tec* Platte pipettiert, für 1 min bei 1200 rpm auf einen Mikroplatten Schüttler gestellt und anschließend für 1 min bei 280 g und 20 °C zentrifugiert. Nachfolgend wurde die Platte in den *Cycler* gestellt und das in Tabelle 7 beschriebene Programm gestartet.

**Tabelle 7: Cycler Programm ‚NRC HYB‘ zur Hybridisierung der *library***

	Temperatur (in °C)	Zeit (in min)
Inkubation	95	10
Hybridisierung	94 jeden Zyklus die Temperatur um 2°C verringern	1 18 Zyklen
<i>Hold</i>	58	min. 90 min

Zwischenzeitlich wurden die ‚*Streptavidin magnetic beads*‘ (SMB), der ‚*Elute target buffer 2*‘ (ET2), der ‚*Enrichment Elution Buffer*‘ (EE1), die ‚*2M NaOH*‘ (HP3) und die ‚*Enrichment Wash Solution*‘ (EWS) auf RT gebracht. Die Streptavidin gekoppelten *Magnetic Beads* banden an die biotinylierten Proben und wurden später separiert. Nachdem die Platte aus dem *Cycler* genommen wurde, wurde sie für 1 min bei 280 g und 20 °C zentrifugiert. Nun wurde der gesamte Inhalt des Wells (100 µl) in eine MIDI Platte überführt und 250 µl *Beads* hinzu pipettiert. Der Ansatz wurde durch Auf- und Abpipettieren vermischt, für 5 min bei 1200 rpm auf einen Mikroplattenschüttler gestellt und anschließend für 25 min bei RT inkubiert. In dieser Zeit binden die *Beads* an die biotinylierten Oligo-Sonden, welche wiederum zuvor an die zu untersuchenden DNA-Proben gebunden hatten.

Nachfolgend wurde die Platte bei 280 g und 20 °C für 1 min zentrifugiert und für weitere 3 min auf einen Magnetstand gestellt. Der dabei entstandene klare Überstand wurde abgenommen und verworfen. Nun wurden 200 µl EWS hinzugegeben und für 4 Minuten bei 1800 rpm auf einem Mikroplatten Schüttler geschüttelt. Nachdem der Ansatz durch Auf- und Abpipettieren nochmals gemischt wurde, wurde der gesamte Inhalt des Wells in eine *twin.tec* Platte überführt. Diese wurde anschließend für 30 min bei 50°C in einem *Cycler* inkubiert. Nach Ablauf der 30 min wurde die Platte sofort für 2 min auf einen Magnetstand gestellt. Der Überstand wurde abgenommen und 200µl EWS hinzugegeben. Anschließend wurde der Ansatz erneut für 4 min bei 1800 rpm auf einem

Mikroplattenschüttler gestellt und durch nachfolgendes, zehnmaliges Auf- und Abpipettieren vermischt. Nun wurde die *twin.tec* Platte noch einmal für 30 min bei 50 °C in einen *Cycler* gestellt und nachfolgend für 2 min unmittelbar auf eine Magnetplatte gestellt. In der Zwischenzeit wurden ein *Elution Pre-Mix* aus 28,5 µl EE1 und 1,5 µl HP3 angesetzt. Nachdem der Überstand aus der Platte abgenommen und verworfen wurde, wurden 23 µl des *Elution Pre-Mix* hinzugegeben und für 2 min bei 1800 rpm auf einem Mikroplattenschüttler gestellt. Anschließend wurde der Ansatz durch Auf- und Abpipettieren vermischt und für 2 min bei RT inkubiert sowie bei 280 g und 20 °C für 1 min zentrifugiert. Durch diesen Vorgang werden die biotinylierten Proben wieder von den *Beads* gelöst. Anschließend wurde die Platte für 3 min auf einen Magnetstand gestellt und je 21 µl des Überstandes in 8er Streifen überführt. Zu diesen wurden dann jeweils 4 µl ET2 zugesetzt. Der Ansatz wurde durch Auf- und Abpipettieren vermischt, für 1 min bei 1200 rpm in einem Mikroplattenschüttler geschüttelt und für eine weitere Minute bei 280 g und 20 °C zentrifugiert.

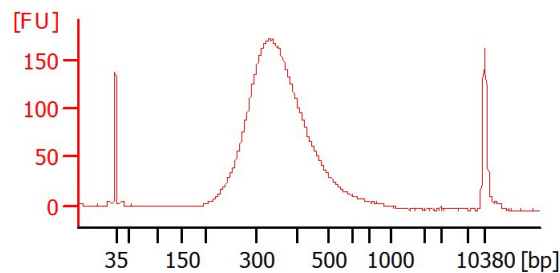
Nachfolgend wurde der Hybridisierungs- und Waschschrift wiederholt.

Für die Hybridisierungsaufreinigung wurden nun 45 µl suspendierte SPB in ein Well der MIDI Platte pipettiert. Durch zehnmaliges Auf- und Abpipettieren sowie einminütiges Schütteln bei 1800 rpm auf einem Mikroplattenschüttler wurde der Ansatz gemischt. Anschließend erfolgte eine Inkubation für 10 min bei RT und eine Zentrifugation für 1 min bei 280 g und 20 °C. Nachfolgend wurde die Platte für 3 min auf einen Magnetstand gestellt und der dabei entstandene Überstand abgenommen und verworfen. Nun wurden 200 µl frisch angesetzten 80%igen Ethanol hinzugegeben und für 30 s inkubiert. Nach Ablauf dieser wurde das Ethanol wieder abgenommen und verworfen. Das Waschen mit Ethanol wurde nochmals auf dieselbe Art wiederholt. Anschließend wurden die *Beads* auf dem Magnetstand für 10 min bei RT getrocknet. Nachfolgend wurden 27,5 µl RSB dazu pipettiert und für eine Minute bei 1800 rpm auf einen Mikroplattenschüttler gestellt. Zusätzlich wurde der Ansatz durch zehnmaliges Auf- und Abpipettieren gemischt. Anschließend erfolgten eine zweiminütige Inkubation bei RT sowie eine Zentrifugation für 1 min bei 280 g und 20 °C. Nachdem die Platte für 3 min auf einen Magnetstand gestellt wurde, wurden 25 µl des Überstandes in einen 8er PCR Streifen überführt.

Nachfolgend wurde die zweite PCR-Amplifikation und -Aufreinigung durchgeführt.

Abschließend wurden 30 µl des Überstandes in ein steriles 1,5 ml Eppendorf® Gefäß überführt und bis zum Start des *MiSeq*® *Runs* eingefroren. Zusätzlich wurden zur Quantifizierung der *library* eine qPCR sowie zur Überprüfung der *library*-Qualität eine Analyse im *Agilent BioAnalyzer*® durchgeführt. Die *library*-Konzentration betrug nach Abschluss der Präparation der ersten *library* 6,81 nmol/l.

Das Ergebnis des *Agilent BioAnalyzer® Runs* ist in Abbildung 11 zu sehen. Der Grafikablauf zeigt die erfolgreiche Hybridisierung der *library*, da die richtige amplifizierte Fragmentgröße (330 bp) dargestellt wird.



**Abbildung 11: Graphische Darstellung des BioAnalyzer® Ergebnisses**

## Quantifizierung der *library* mithilfe der qPCR

Die quantitative *Real Time-PCR* (qPCR) dient dem Nachweis der durch die PCR neu synthetisierten DNA-Sequenzen in Echtzeit. Die Methodik der qPCR ist in Kapitel 2.3.4 beschrieben und kann dort nachgelesen werden. Für die qPCR im *Rotor-Gene® Q* wurden zunächst der DNA Standard, die Primer und *SYBR Green®* aus dem *GeneRead library Quant Kit* auf Eis aufgetaut, gevortext sowie abzentrifugiert. Aus dem *SYBR Green®* Farbstoff, RNase freien Wasser und dem Primer Mix wurde dann der *PCR-Mastermix* für elf Proben hergestellt. Das genaue Mischungsverhältnis ist in Tabelle 8 nachzulesen.

Die elf Proben ergeben sich durch fünf Standard-Proben, in welchen der Standard je unterschiedlich konzentriert vorliegt, drei *library*-Proben in jeweils unterschiedlicher Konzentration, sowie drei *PhiX library*-Proben, ebenfalls in unterschiedlicher Konzentration. Die *PhiX library* Probe ist eine einsatzbereite Kontroll-*library* für den Sequenzierungsablauf.

**Tabelle 8: Reaktionsansatz für den PCR-Mastermix**

Reagenz	Volumen für 11 Proben (in µl)
RNase freies Wasser	348,4
<i>SYBR Green®</i> Farbstoff	520
Primer Mix	36,3
<b>Summe</b>	<b>904,7</b>

Anschließend wurden für die DNA *library* sowie für jede weitere Probe Verdünnungen nach einem vorgegebenen Schema, wie in Tabelle 9 beschrieben, angesetzt.

**Tabelle 9: Verdünnungsschema für die zu untersuchenden Proben**

Verdünnung	Inhalt
Standard 1 (20 pM)	5 µl Standard unverdünnt + 45 µl <i>Dilution Buffer</i>
Standard 2 (2 pM)	5 µl Standard 1 + 45 µl <i>Dilution Buffer</i>
Standard 3 (0,2 pM)	5 µl Standard 2 + 45 µl <i>Dilution Buffer</i>
Standard 4 (0,02 pM)	5 µl Standard 3 + 45 µl <i>Dilution Buffer</i>
Standard 5 (0,002 pM)	5 µl Standard 4 + 45 µl <i>Dilution Buffer</i>
<i>PhiX library</i> (1:20)	2 µl <i>LibrPhiX</i> + 38 µl <i>Dilution Buffer</i>
<i>PhiX library</i> (1:2000)	2 µl <i>LibrPhiX</i> 1:20 + 198 µl <i>Dilution Buffer</i>
<i>PhiX library</i> (1:20.000)	5 µl <i>LibrPhiX</i> 1:2000 + 45 µl <i>Dilution Buffer</i>
<i>DNA library</i> (1:20)	2 µl <i>library DNA</i> + 38 µl <i>Dilution Buffer</i>
<i>DNA library</i> (1:2000)	2 µl <i>library DNA</i> 1:20 + 198 µl <i>Dilution Buffer</i>
<i>DNA library</i> (1:20.000)	5 µl <i>library DNA</i> 1:2000 + 45 µl <i>Dilution Buffer</i>

Anschließend wurde für eine Negativ Probe, welche ausschließlich *Dilution Buffer* enthielt, die Standards 1-5 und die auf 1:2000 und 1:20.000 verdünnten DNA- und *PhiX-libraries* jeweils 3 *Rotor-Gene® tubes* (=30 *tubes*) beschriftet. Nun wurden im Kühlrack je 10 µl von den Standardproben 1-5, der Negativ-Kontrolle, den *DNA libraries* 1:2000 und 1:20.000 sowie den *PhiX libraries* 1:2000 und 1:20.000 entnommen und jeweils mit 70 µl *MasterMix* zusammen in ein *Eppendorf® tube* pipettiert, wodurch sich je ein Gesamtvolumen von 80 µl ergab. Nachfolgend wurden 20 µl jedes Ansatzes auf je drei *Rotor-Gene® tubes* verteilt. Die *tubes* wurden verschlossen und entsprechend ihrer Nummerierung in den Rotor gestellt. Anschließend wurde das Programm ‚*MiSeq*‘ (Tab. 10) im *Rotor Gene®* gestartet.

**Tabelle 10: *Rotor Gene®* Programm für qPCR**

Zyklen	Dauer	Temperatur (in °C)
1	10 min	95
30	15 s	95
	5 s	68
	5 s	65
	60 s	60

Für eine quantitative Analyse wurde zudem der  $C_t$ -Wert (s. Kapitel 2.3.4) ermittelt. Die gemessenen  $C_t$ -Werte betragen bei der *library* mit 1:2000 Verdünnung im Mittel 6,28 und bei der *library* mit 1:20.000 Verdünnung 9,81. Die ermittelte Konzentration der Proben-DNA *library* betrug 6,81 nmol/l.

Anschließend wurden sowohl die Proben-DNA- als auch die *PhiX* Kontroll-*library* bis zu ihrer weiteren Verwendung eingefroren.

## **Vorbereitung des *MiSeq*<sup>®</sup>-Runs**

Zunächst wurde die Reagenzkartusche für das *MiSeq*<sup>®</sup>-Gerät für 60 min in raumtemperiertem Wasser aufgetaut, während der HT1 Puffer bei RT aufgetaut und dann auf Eis gelagert wurde. Vor dem Starten des *Runs* wurde zudem eine Gerätespülung durchgeführt. Anschließend wurden die *PhiX Kontroll library* und die zu sequenzierende *MiSeq*<sup>®</sup> *library* auf Eis aufgetaut. Nun wurde eine 0,2 molare Natriumhydroxid-Lösung angesetzt (800 µl autoklaviertes Wasser + 200 µl 1 M NaOH) sowie 15 ml Tris HCl mit 15 µl *Tween* 20 versetzt.

### **Denaturieren der *PhiX library***

Nun wurden 2 µl der 10 nM *PhiX library* mit 3 µl der zuvor angesetzten Tris-HCl / 0,1% *Tween* 20 Lösung zusammen pipettiert und zusätzlich 5 µl 0,2 molare Natronlauge zugesetzt. Dies dient der Denaturierung der *PhiX library*. Der Ansatz wurde kurz gevortext, für eine Minute bei 280 g zentrifugiert und für 5 min bei RT inkubiert. Die 10 µl der nun denaturierten *PhiX library* wurden mit 990 µl HT1 vermischt, wodurch sich eine 20 pM *PhiX Library* ergab. Von dieser wurden 300 µl abgenommen und mit 300 µl HT1 vermischt, wodurch sich eine Endkonzentration von 10 pM ergab. Die denaturierte und verdünnte *PhiX library* wurde bis zum Beladen der Reagenzkartusche auf Eis gestellt.

### **Denaturieren der DNA *library***

Anschließend erfolgte die Denaturierung der zu sequenzierenden DNA. Dazu wurden 5 µl 4 nanomolarer DNA *library* mit 5 µl 0,2 molarer Natronlauge vermischt und für 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden 990 µl HT1 hinzugegeben, wonach eine denaturierte 20 pM-*library* vorlag. Für die weitere Verdünnung auf 10 pM wurden 300 µl der 20 pM *library* mit 300 µl HT1 vermischt.

### **Poolen der *libraries* und Starten des *Runs***

Nun wurden 45 µl der 10 pM *PhiX* Kontrollbibliothek mit 555 µl der 10 pM Probenbibliothek vermischt. Der Ansatz wurde mehrmals vorsichtig geschwenkt und kurz zentrifugiert. Anschließend wurde die gesamte Lösung von 600 µl in die Kartusche geladen und der Lauf gestartet. Dieser dauerte etwa 27 Stunden.

### 2.3.4 Quantitative *Real Time*-PCR

Für die Durchführung des *Next-Generation sequencing* ist es wichtig, dass die DNA-Menge in allen eingesetzten Proben gleich ist. Diese Quantifizierung der *NGS library* erfolgt mittels qPCR. Der Ablauf diesbezüglich ist in den Kapiteln 2.3.3 und 2.3.8 beschrieben. Im Folgenden wird die Methodik der qPCR erläutert.

Die Polymerase-Kettenreaktion (engl. *polymerase chain reaction*, PCR) dient der gezielten Amplifikation eines spezifischen Bereichs des Genoms. Der PCR-Prozess besteht aus 20- bis 50-mal sich wiederholenden Zyklen, die in einem *Thermocycler* durchgeführt werden und aus je drei Schritten bestehen. Zunächst erfolgt eine Denaturierung der DNA durch Erhitzen auf 94°C. Anschließend kommt es bei 55°C zur *Annealing* der Primer, das heißt die Oligonucleotidprimer lagern sich an die für sie spezifischen einzelsträngigen DNA-Sequenzen an. Der letzte Schritt ist die Elongation durch die DNA-Polymerase, welche ausgehend von Primer komplementär zum vorhandenen DNA-Strang einen neuen Strang synthetisiert. Dieser dreiteilige Zyklus wird mehrfach wiederholt, bis eine ausreichende DNA-Menge vorliegt (37). Pro Zyklus (Anzahl  $n$ ) entstehen  $2^n$  Kopien der gewünschten Sequenz. Die Methode ist in der Abbildung 12 dargestellt: (1) dsDNA dient als Ausgangssubstanz. (2) & (3) Durch die hohen Temperaturen liegt aufgetrennte DNA vor, an welche sich Primer anlagern. (4) Ausgehend von den Primern synthetisieren DNA-Polymerasen komplementäre Stränge. (5) Bei einem erneuten Zyklus trennen sich neuer und alter Strang. (6) Es lagern sich erneut Primer an, von wo an erstmals eine Sequenz in der gewünschten Länge entsteht (37).

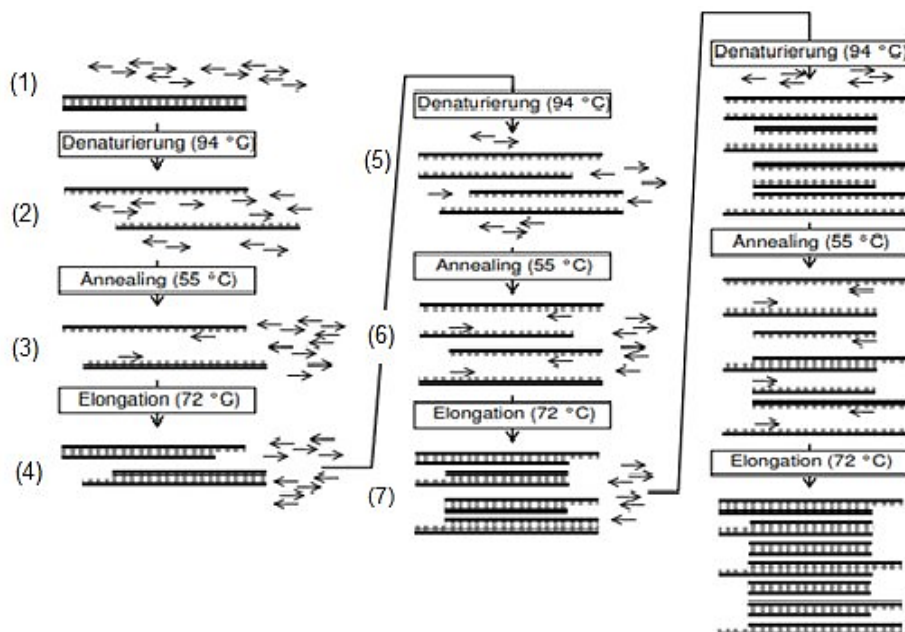


Abbildung 12: Ablauf einer klassischen PCR (37)

Die hier eingesetzte quantitative *Real Time*-PCR (auch qPCR genannt) ermöglicht den Nachweis der Entstehung der durch die PCR neu synthetisierten primerspezifischen DNA-Sequenzen in Echtzeit. Dafür lagert sich bei der Reaktion ein unspezifischer Fluoreszenzfarbstoff (hier: *SYBR Green*<sup>®</sup>) an die zuvor synthetisierten dsDNA-Moleküle an und emittiert Fluoreszenzsignale. Mithilfe der Messung der Fluoreszenz durch den *Rotor-Gene*<sup>®</sup> Q kann die Menge des amplifizierten PCR-Produkts nach jedem Zyklus exakt bestimmt werden.

Für die quantitative Analyse muss zudem der  $C_t$ -Wert (*cycle threshold* – Schwellenwertzyklus) bestimmt werden. Dieser spiegelt den Zyklus wider, in welchem die Fluoreszenz erstmals exponentiell über den Hintergrundwert ansteigt. Durch Vergleich des  $C_t$ - Wertes wird deutlich, welche Probe vor der Amplifizierung mehr DNA enthielt (37). Der  $C_t$  Wert sollte für alle eingesetzten Proben ungefähr gleich sein, nämlich unter 30 und nicht mehr als 3 Werte voneinander abweichen.

### 2.3.5 Bioinformatische Auswertung der NGS Daten

Die Daten wurden mit dem Programm ‚*Illumina Variant Studio*‘ v3.0 ausgewertet. Dabei wurden folgende Filter im Programm ausgewählt:

- minimale *Population Frequency* in der globalen sowie europäischen Bevölkerung von <0,05% (bei *Thousand Genoms*<sup>®</sup> und *ExAC*<sup>®</sup>)
- *Consequence* (,only variants that are *Missense, frame-shift, Stop gained / lost, Initiator codon, In-frame insertion / deletion, Splice*)
- eine *Alternate Allele Frequency* von >30%, eine *Coverage* von >40 sowie der PASS-Filter.

Letzteres diene der Reduzierung falsch-positiver Varianten. Die Festsetzung der Frequenz auf eine maximale Häufigkeit von 0,05% zielte darauf ab, häufige und damit wahrscheinlich benigne Varianten auszusortieren. Durch die Voraussetzung einer Konsequenz der Basenvariante wurden stumme Mutationen, also solche, durch welche trotz anderer Base dieselbe Aminosäure kodiert wird, nicht berücksichtigt. Das Ziel war es, seltene Varianten zu identifizieren, welche sehr wahrscheinlich pathogen waren, bei simultaner Minimierung falsch-positiver Ergebnisse.

Die detektierten Varianten wurden mit Vorhersageprogrammen (*Align GVGD*<sup>®</sup>, *SIFT*<sup>®</sup>, *Mutation Taster*<sup>®</sup>, *PolyPhen-2*<sup>®</sup>, *SNPs&Go*<sup>®</sup>) und Datenbanken (*Human Gene Mutation Database (HGMD)*<sup>®</sup>, *ExAC*<sup>®</sup>, *Exome Variant Server*<sup>®</sup>, *gnomAD*<sup>®</sup>) im *Alamut*<sup>®</sup> Programm analysiert.

### 2.3.6 Beurteilung der detektierten Varianten

Jedes Individuum unterscheidet sich von anderen durch geringgradige Veränderungen in seinem Genom. Solche *single nucleotides variations (SNV)*, die bei jedem Menschen etwa 3,3 Millionen Mal existieren, sind zum überwiegenden Teil harmlos und nicht kausal für eine Erkrankung. Anhand des Auftretens einer SNV in der Bevölkerung, genauer gesagt anhand der *minor allele frequency (MAF)*, erfolgte vormals eine Einschätzung dieser SNVs als *single nucleotide polymorphism (SNP, MAF >1%)*, *mutation (MUT, MAF >0,1%)* oder *variant of uncertain significance (VUS, MAF >0,5%)* (38).

Nach aktuellerer Nomenklatur werden fünf Klassen von Varianten unterschieden. So werden Klasse 4 und Klasse 5 Varianten als pathogen bezeichnet (ehemals als ‚Mutation‘ bezeichnet), wohingegen Varianten der Klasse 1 und 2 als Polymorphismen (entspricht den ehemaligen SNPs) bezeichnet werden. Darüber hinaus gibt es Klasse 3 Varianten, ehemals VUS. Diese können nicht eindeutig den anderen Klasse zugeordnet werden oder aber sind nach derzeitigen Forschungsstand kontrovers bezüglich ihrer Pathogenität einzuordnen (38). Die Herausforderung bestand nun darin, die detektierten Genvarianten richtig in eine der Klassen einzuordnen.

Anhand der aus den *Prediction*-Programmen, Populations- sowie Pathogenitätsdatenbanken resultierenden Ergebnissen wurden die detektierten Varianten zwischen Klasse 1 (benigne) und Klasse 5 (pathogen) eingeteilt. Diese Einteilung erfolgte entsprechend den Richtlinien des *American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG)* für die Interpretation von Sequenzvarianten (39). Weitere Informationen bezüglich der *ACMG*-Kriterien sind im Anhang auf Seite II-V nachzulesen.

### 2.3.7 Pathogenitätsvorhersageprogramme

Die detektierten Varianten wurden mithilfe von vier Programmen interpretiert. Diese eingesetzten Online-Programme dienen der Einschätzung der Pathogenität der detektierten Sequenzvarianten. Mithilfe eines programm-individuellen Algorithmus berechnet das Programm den möglichen Effekt einer Variante und gibt Auswirkungen auf Nukleotid-, Aminosäuren- und Proteinlevel an. Ebenso wird häufig berücksichtigt, ob ein Effekt auf die nächst gelegene *Splice Site* besteht. Die Genauigkeit dieser *PredictionTools* wird in der Literatur mit 65-80% angegeben, sofern es sich um bekannte Sequenzvarianten handelt (39).



In dieser Arbeit wurden vier *PredictionTools* eingesetzt und zwar die Folgenden:

- *Mutation Taster* (<http://www.mutationtaster.org>)
- *PolyPhen2* (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2>)
- *SIFT* (<http://sift.jcvi.org>)
- *SNPs and GO* (<http://snps-and-go.biocomp.unibo.it/snps-and-go>)
- *VarCards* (<http://varcards.biols.ac.cn/>)

Während *SIFT* nur die evolutionäre Konservierung und *SNPs and Go* ausschließlich die Proteinstruktur und -funktion berücksichtigt, beziehen *Mutation Taster* und *PolyPhen* je beide Aspekte in ihre Berechnungen mit ein. Durch *VarCards*<sup>®</sup> kann eine simultane Analyse von zahlreichen (nach eigenen Angaben über 60) *Prediction* Programmen auf einmal erfolgen. Zum Teil war auch eine Bewertung der Auswirkungen auf die *Splice Site* durch gesonderte *Splice Site Prediction* Programme notwendig. In solchen Fällen wurden *SpliceSiteFinder-like*<sup>4</sup>, *MaxEntScan*<sup>5</sup>, *NNSPLICE*<sup>6</sup> und *GeneSplicer*<sup>7</sup> eingesetzt.

Darüber hinaus erfolgte eine Einschätzung bezüglich der Konservierung des Nukleotids mithilfe der Programme *Align GVDG*<sup>8</sup>, *phyloP*<sup>9</sup> und durch den *Grantham Score*, welcher den Unterschied eines Aminosäureaustausches im evolutionären Sinne auf einer Skala von 5 bis 215 einschätzt. Ein hoher Score bedeutet eine große evolutionäre Distanz und legt einen pathogenen Effekt des Austausches nahe (40).

Darüber hinaus wurden Populationsdatenbanken eingesetzt, in welchen die Allelfrequenz der detektierten Variante in Vergleichspopulationen angegeben war. Zu den verwendeten Datenbanken zählen *Exome Aggregation Consortium (ExAC)*, *Exome Variant Server*, *gnomAD*, *1000 Genomes* und *dbSNP*. Je höher die Allelfrequenz einer Variante dort angegeben war, desto unwahrscheinlicher war eine Pathogenität der Variante.

Neben solchen Populationsdatenbanken gibt es außerdem *disease databases*, in welchen Varianten enthalten sind, welche bei erkrankten Patienten gefunden wurden. Zu diesen Datenbanken zählen *ClinVar*<sup>®</sup> und *Human Gene Mutation Database (HGMD)*<sup>®</sup>, welche beide in dieser Arbeit eingesetzt wurden.

---

<sup>4</sup> Keine Website verfügbar, da das Programm nur über Alamut<sup>®</sup> genutzt werden kann. Siehe auch <https://www.interactive-biosoftware.com/doc/alamut-visual/2.11/splicing.html>

<sup>5</sup> [http://genes.mit.edu/burgelab/maxent/Xmaxentscan\\_scoreseq.html](http://genes.mit.edu/burgelab/maxent/Xmaxentscan_scoreseq.html)

<sup>6</sup> [http://www.fruitfly.org/seq\\_tools/splice.html](http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html)

<sup>7</sup> [http://www.cbcb.umd.edu/software/GeneSplicer/gene\\_spl.shtml](http://www.cbcb.umd.edu/software/GeneSplicer/gene_spl.shtml)

<sup>8</sup> [http://agvgd.iarc.fr/agvgd\\_input.php](http://agvgd.iarc.fr/agvgd_input.php)

<sup>9</sup> <http://compugen.bscc.cornell.edu/phast/>

### 2.3.8 Validierung der Variationen mittels Sanger-Sequenzierung

Jegliche relevante, in der *MiSeq*<sup>®</sup>-Analyse gefundene Mutation wurde anschließend zusätzlich mit der klassischen Sanger-Sequenzierung validiert. Ebenso wurden zwei Kinder eines Index-Patienten, bei welchem eine kausale Genmutation im Rahmen der *MiSeq*<sup>®</sup>-Gendiagnostik festgestellt wurde, im Einzelmutationsnachweis-Verfahren auf die beim Vater detektierte Genmutation hin untersucht.

Die Sanger-Sequenzierung (auch ‚Kettenabbruch-Synthese‘) wurde erstmal 1977 von Frederick Sanger et al. in der Veröffentlichung „*DNA Sequencing with chain-terminating inhibitors*“ beschrieben. Zusätzlich zu den üblichen 2′-Desoxynucleotidtriphosphaten werden bei der klassischen Sanger-Methode auch 2′3′-Didesoxynucleotidtriphosphate eingesetzt, welche die Kettenelongation stoppen (‚*chain-terminating inhibitors of DNA polymerase*‘). Darüber hinaus neuartig war bei Sanger der Einsatz von radioaktiven Phosphat- oder Sulfat-Isotopen, welche in den neu synthetisierten DNA-Fragmenten inkorporiert waren, wodurch die Produkte durch Radiographie detektierbar wurden (41).

In vier Reaktionsansätzen wird je ein 2′,3′-Didesoxynucleotidtriphosphat (A, G, C oder T) mit zusätzlich allen vier 2′-Desoxynucleotidtriphosphaten in einem Reaktionsansatz vermischt. Dieser enthält darüber hinaus die zuvor denaturierte, zu untersuchende ssDNA, eine DNA-Polymerase I sowie ggf. spezifische Primer, sofern nur ein bestimmter DNA-Abschnitt untersucht werden soll. Immer wenn die DNA-Polymerase in der darauffolgenden Inkubationszeit zufällig ein ddNTP statt eines dNTPs einbaut, bricht die Extension des neu synthetisierten Stranges ab und ein DNA-Fragment bestimmter Länge entsteht.

Insgesamt ergibt sich so eine Mischung verschieden großer radioaktiver DNA-Produkte, welche nun in einer Gelelektrophorese individuell nach ihrer Molekülmasse aufgetrennt und anhand der Radioaktivität detektiert werden. Anschließend kann man anhand des ddNTP-Reaktionansatzes sowie der Laufstrecke, die der Fragmentlänge entspricht, auf die eingebaute Base schließen. Die zu der resultierenden Sequenz komplementäre Sequenz ist die Basenabfolge des eingesetzten DNA-Stranges (42).

Auch wenn es seit der Veröffentlichung der Methode 1977 zahlreiche Veränderungen und Modifikationen gab, wie beispielsweise der Einsatz von Fluoreszenzfarbstoffen statt Radioaktivität, welche zudem einen gemeinsamen Reaktionsansatz erlaubt, so ist das Grundprinzip bis heute dasselbe.

## Amplifikation des Genabschnittes mittels PCR

Zunächst erfolgte ein manueller PCR-Ansatz, durch welchen die Gensequenz mit der detektierten Mutation vervielfältigt werden sollte. Dazu wurde als Erstes die benötigte Patienten-DNA, welche eine Konzentration von etwa 30 ng/μl aufwies, aufgetaut sowie gevortext und abzentrifugiert. Für die Primer wurden zum Teil bereits etablierte Primer des IfGH verwendet sowie zum anderen Teil Primer des jeweiligen Exons neu entworfen (nach den Kriterien wie in Kapitel 2.3.10 beschrieben) und validiert.

Die eingefrorenen *up*- und *low*-Primer, welche je eine Konzentration von 100 pmol/μl aufwiesen, wurden aufgetaut und mit destilliertem Wasser auf eine Konzentration von 10 pmol/μl verdünnt. Neu bestellte Primer wurde zunächst mit TE-Puffer gelöst und anschließend ebenfalls auf 10 pmol/μl verdünnt. Die genaue Zusammensetzung des Ansatzes für 30 Proben ist in Tabelle 11 nachzulesen. Für die Validierung der neu entworfenen Primer waren zudem zwei Kontroll-DNA Proben notwendig, um zwei Wildtyp-Referenzsequenzen zum Vergleich zu erhalten.

**Tabelle 11: Primer Gebrauchslösung 15pmol/Ansatz für 30 Proben**

Reagenz	Volumen (in μl)
H <sub>2</sub> O	231
up-Primer	4,5
low-Primer	4,5
<b>Summe</b>	<b>240</b>

Anschließend wurde ein *Mastermix* aus Wasser, PCR-Puffer, dNTP-Mix und *HotStar Taq*<sup>®</sup> Polymerase angesetzt. PCR-Puffer, dNTP-Mix und Polymerase entstammten dem *HotStarTaq*<sup>®</sup> *DNA Polymerase* Kit von QIAGEN<sup>®</sup>. Zusätzlich zu dem zweifachen Ansatz jedes zu untersuchenden Gens wurde pro Primerpaar eine Negativ-Kontrolle mit Wasser angesetzt, um eine Kontamination auszuschließen. Die genaue Zusammensetzung des Ansatzes ist in Tabelle 12 nachzulesen.

**Tabelle 12: MasterMix Zusammensetzung für 18 Proben**

Reagenz	Volumen (in µl)
H <sub>2</sub> O	178
PCR-Puffer, 10x	50
dNTP (2mM)	50
<i>HotStar Taq</i> <sup>®</sup> (5 U/µl)	2
<b>Summe</b>	<b>252</b>

Nun wurden je 14 µl des *Mastermixes* in die Wells eines 8er Streifen pipettiert und anschließend je 8 µl Primergemisch sowie je 3 µl DNA hinzugefügt. Da sechs der 15 Ansätze das Programm ‚P65-55\_3‘ im *Cycler* durchlaufen mussten und die anderen neun das Programm ‚P65-55\_2‘, wurden die Proben auf verschiedene 8er Streifen verteilt. Die Streifen wurden verschlossen und in zwei *Cycler* gestellt. Anschließend wurde das entsprechende Programm gestartet. Der genaue Ablauf der Programme ist in den Tabellen 13 und 14 beschrieben. Für diese Arbeit wurde eine *HotStar*<sup>®</sup> *Taq Plus* Polymerase eingesetzt, welche mit einer DNA-Syntheserate von bis zu 4.000 Nukleotiden pro Minute arbeitet. Zur Aktivierung der Enzymfunktion der *HotStar*<sup>®</sup> *Taq Plus* Polymerase wurde zuvor eine fünf minütige Inkubation bei einer Temperatur von 95°C benötigt.

**Tabelle 13: PCR-Programm P65-55\_2**

Schritt	Temperatur (in °C)	Zeit (in min)
Denaturierung	95	1
Zwei Schritt Zyklus (40x):		
- <i>Annealing</i>	65-55	1,5
- <i>Extension</i>	72	1

**Tabelle 14: PCR-Programm P65-55\_3**

Schritt	Temperatur (in °C)	Zeit (in min)
Denaturierung	95	1
Zwei Schritt Zyklus (45x):		
- <i>Annealing</i>	65-55	1,5
- <i>Extension</i>	72	1

Für die Validierung der sechs neu designten Primer wurde ein weiterer PCR-*Mastermix* angesetzt, dessen genaue Zusammensetzung in Tabelle 15 nachzulesen ist.

**Tabelle 15: *MasterMix* Zusammensetzung für 12 Proben**

Reagenz	Volumen (in $\mu\text{l}$ )
H <sub>2</sub> O	115,7
PCR-Puffer, 10x	32,5
dNTP (2mM)	32,5
HotStar Taq <sup>®</sup> (5 U/ $\mu\text{l}$ )	1,3
<b>Summe</b>	<b>182</b>

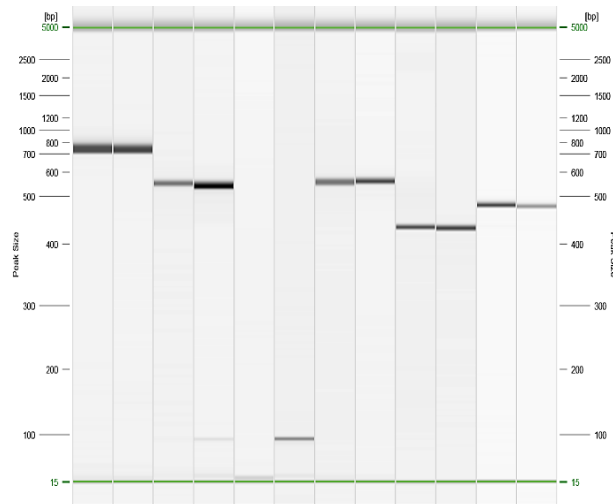
Die Ansätze mit den neu zu validierenden Proben durchliefen ebenfalls das PCR-Programm 65-55\_2.

## Elektrophorese der PCR-Produkte

Nachfolgend wurden die PCR-Produkte nach erfolgter PCR elektrophoretisch auf Qualität und Quantität überprüft. Dazu wurde eine Gelkartusche aus dem *QIAxcel<sup>®</sup> DNA Screening Kit* vorbereitet, das heißt, sie wurde eine Stunde lang senkrecht im Kartuschenhalter bei RT aufgestellt.

Anschließend wurden je 3  $\mu\text{l}$  PCR-Produkt im Verhältnis 1:5 mit je 12  $\mu\text{l}$  *QX DNA Dilution Buffer* in einer PCR 96-Well Platte verdünnt, womit sich ein Endvolumen von 15  $\mu\text{l}$  ergab. Die Platte wurde in den *QIAxcel<sup>®</sup>* gestellt und die Elektrophorese gestartet.

Ein beispielhaftes Ergebnis der Elektrophorese ist in Abbildung 13 zu sehen. Man sieht Banden, die DNA-Fragmente unterschiedlicher Länge darstellen. Die fünfte und sechste Probe waren Wasserproben, welche keine Banden relevanter Länge erzeugten, sodass eine Kontamination ausgeschlossen werden konnte. Alle PCR-Produkte wiesen in ihren spezifischen Fragmentlängen-Banden eine Konzentration von über 0,25 ng/ $\mu\text{l}$  auf. Insgesamt ist die PCR als erfolgreich zu werten, sodass die PCR Aufreinigung erfolgen konnte.



**Abbildung 13: Elektrophorese Ergebnis<sup>10</sup>**

## Aufreinigung der PCR

Dazu wurden zunächst 15 µl des *ExoSAP-It*<sup>®</sup> Enzyms mit 15 µl 1x PCR-Puffer zu einem *Mastermix* vermischt. Der 1x PCR-Puffer entstammt dem 10x PCR Puffer aus dem *HotStarTaq DNA Polymerase* Kit von QIAGEN<sup>®</sup> und wurde mit Wasser 1:10 verdünnt.

Anschließend wurden je 5 µl des PCR-Produktes sowie je 2 µl *Mastermix* in eine 96-Well PCR-Platte pipettiert. Die Platte wurde mit einer transparenten Klebefolie verschlossen und kurz zentrifugiert. Nachfolgend wurde die Platte in einen *Cycler* gestellt und das Programm ‚P37-80\_ExoSap‘ gestartet.

Dieser inkubiert zunächst bei 37 °C für 45 min und deaktiviert anschließend das *ExoSAP-It*<sup>®</sup> Enzym bei 80 °C für 12 Minuten. Anschließend wurde die Platte kurz zentrifugiert. Nachfolgend wurden je 20 µl Wasser auf die 7 µl des gereinigten PCR-Produktes pipettiert.

## Sanger Sequenzierung

Anschließend erfolgte die manuelle Sanger-Sequenzierung. Die zuvor aufgetauten Stammlösungen der benötigten Primer wurden von 100 pmol/µl auf 1,0 pmol/µl verdünnt. Dies erfolgte durch Zugabe von Wasser im Verhältnis 1:100. Anschließend wurden die Lösungen miteinander vermischt. Dann wurde der *Mastermix* für den Sequenzierungsansatz angemischt, dessen genaue Zusammensetzung in Tabelle 16 nachzulesen ist.

<sup>10</sup> Abbildung aus eigenständig durchgeführter PCR übernommen

**Tabelle 16: Reaktionsansatz für den SEQ-Mastermix (berechnet für 20 Probenansätze)**

Reagenz	Volumen (in $\mu\text{l}$ )
H <sub>2</sub> O	34
5x Sequenzier-Puffer	51
<i>Big Dye</i> <sup>®</sup> Terminator Mix	17
<b>Summe</b>	<b>102</b>

Nun wurden zunächst 3  $\mu\text{l}$  jedes *up*- sowie jedes *low*-Primer in jeweils ein Well einer PCR 96 Well-Platte pipettiert und anschließend je 4  $\mu\text{l}$  des zugehörigen PCR-Produktes hinzugefügt. Nun wurden je 3  $\mu\text{l}$  des *SEQ-Mastermixes* hinzugefügt und die Platte mit einer transparenten Klebefolie verschlossen. Die Platte wurde anschließend kurz anzentrifugiert und in den *Thermocycler* gestellt. An diesem wurde das Programm ‚*SEQ S50*‘, dessen Ablauf in Tabelle 17 nachzulesen ist, ausgewählt und gestartet.

**Tabelle 17: Thermo Cycler Programm 'SEQ S50'**

Schritt	Temperatur (in °C)	Dauer
<b>Aktivierung</b>	96	4 min
<b>Drei Schritt Zyklus (30x):</b>		
- Denaturierung	96	20 sec
- <i>Annealing</i>	50	10 sec
- Extension	60	4 min

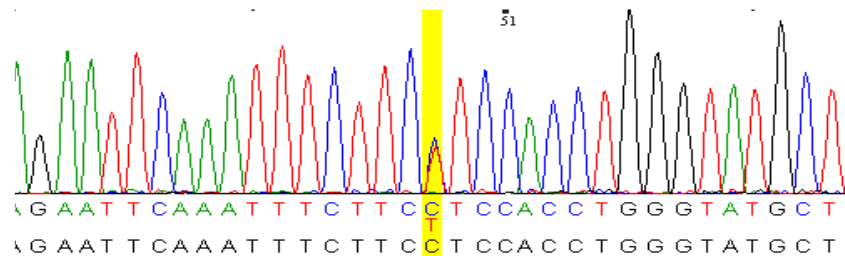
## Aufreinigung der Sequenzier-Reaktion

Nun wurde ein *Mastermix* aus 5  $\mu\text{l}$  (je Probe) *BDTX*-Terminator und 22,5  $\mu\text{l}$  (je Probe) *SAM-Solution* in einem *Falcon Tube* angesetzt. Beide Substanzen stammen aus dem *BigDye*<sup>®</sup> *Xterminator*<sup>™</sup> *Purification Kit*. Der *Mastermix* von 825  $\mu\text{l}$  (für 30 Proben) wurde anschließend gleichmäßig mit 98  $\mu\text{l}$  pro Well auf die 8 *Deep Well Tubes* verteilt. Anschließend wurden mithilfe der Mehrkanalpipette 27,5  $\mu\text{l}$  der Suspension aus jedem Well entnommen und auf die 10  $\mu\text{l}$  Sequenzreaktion verteilt. Die PCR 96-Well Platte wurde mit einer PCR-Folie verschlossen und bei 2000 rpm für 30 min geschüttelt. Anschließend wurde die Platte für 2 min bei 1000 g zentrifugiert. Dann wurden durch den Robotor *Tecan EVO*<sup>®</sup> 100 je 5  $\mu\text{l}$  Überschuss aus der PCR 96-Well Platte entnommen und auf eine *Optical Reaction* Platte überführt. Nachfolgend wurden noch 5  $\mu\text{l}$  Formamid zu den 5  $\mu\text{l}$  Sequenzierprodukt hinzugefügt.

Anschließend konnte die kapillarelektrophoretische Auftrennung am *Genetic Analyzer*® 3500xL erfolgen. Mit diesem erfolgt schließlich die Detektion der fluoreszenzmarkierten DNA-Fragmente.

## Analyse der Sequenzdaten

Die Elektropherogramme (*abi1 files*) des *Genetic Analyzer*® wurden im Programm *GenSearch*® 4.3 ausgewertet. Dazu wurden nur die Sequenz des relevanten Exons sowie der angrenzenden intronischen Bereiche (bis zu 10 Basen in das benachbarte Intron) mit der Referenzsequenz verglichen. Anschließend zeigte eine Grafik die detektierten Sequenzänderungen. Ein beispielhaftes Analyseergebnis eines Patienten ist in Abbildung 14 zu sehen. Die gelb markierte Veränderung zeigt dort einen heterozygoten Austausch einer Cytosin Base gegen eine Thymin Base.



**Abbildung 14: Sequenzanalyse des Exon 22 von RYR2**

### 2.3.9 DNA-Isolation

Die Isolation genomischer DNA erfolgte aus zuvor aus EDTA-Blut gewonnenen Leukozyten semi-automatisch mithilfe des *QIACub*® Gerätes. Dazu wurden zunächst 2 ml Reaktionsgefäße, 1,5 ml Probenröhrchen mit Gewinde und Schraubverschlüsse autoklaviert. Anschließend wurde von den Leukozyten eine kleine Menge (etwa 1mm großes Stück) isoliert und in einem 2 ml Reaktionsgefäß mit 200 µl PBS-Puffer vermischt. Neben den Leukozyten Proben wurde außerdem eine Negativkontrolle mit H<sub>2</sub>O mitgeführt, um später eine Kontamination auszuschließen. Die Reaktionsgefäße mit den Leukozytenlysaten wurden in den *QIACube*® gestellt und das Isolationsprogramm gestartet. Am Ende des automatischen Programms waren jeweils ca. 300 µl DNA gewonnen. Die Konzentration der DNA wurde bestimmt und ggf. auf 30 ng/µl verdünnt. Ebenso wurde die Qualität der DNA im *QIAXcel*®-Gerät (Fertiggel-Elektrophorese System) überprüft, um die gewonnene DNA als hochmolekulare DNA zu bestätigen und eine beginnende Degradierung o.ä. auszuschließen. Im *QIAXcel*® erfolgt eine semiautomatische Auftrennung von je 15 µl der neu isolierten DNA unter Anwendung des *QIAXcel*® DNA Screening Kits. Die DNA wurde, bis zu ihrer weiteren Verwendung, bei -20 °C tiefgefroren gelagert.



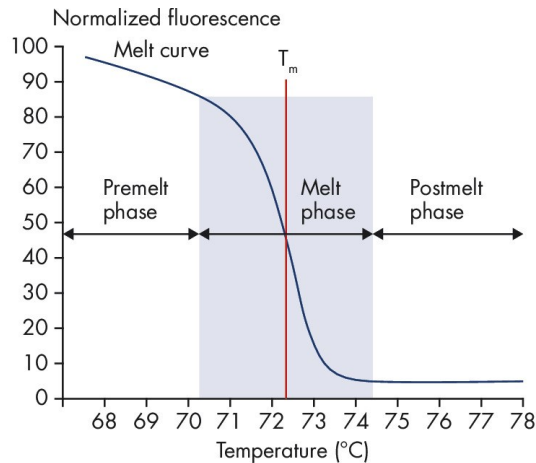
### 2.3.10 HRM PCR Analyse

Um Probenverwechslungen mit großer Wahrscheinlichkeit ausschließen zu können, sollte eine Methode etabliert werden, mit welcher DNA-Proben in Bezug auf in Genen des Genpanels lokalisierten Basensubstitutionen, die in der allgemeinen Bevölkerung relativ häufig vorkommenden *single nucleotide polymorphisms* (SNPs) genotypisiert werden können, um nachfolgend den ermittelten Genotyp mit dem Ergebnis des NGS Genotypes zu vergleichen. Hierfür wurde die *high resolution melting* PCR (HRM-PCR) ausgewählt. Im Folgenden wird die Funktionsweise der HRM kurz vorgestellt.

Die *High-Resolution-Melt* (HRM) Analyse ist eine Methode, minimale Basenvariationen innerhalb von DNA-Sequenzen zu erkennen. Innerhalb einer Bevölkerung beobachtet man natürlich vorkommende Variationen in Bezug zur Referenzsequenz, die keine funktionelle Relevanz haben. Als *Single Nucleotide Polymorphisms* (SNPs) bezeichnet man dabei einzelne Basenveränderungen im Genom mit einer Allelfrequenz von mehr als 1% in der Vergleichspopulation.

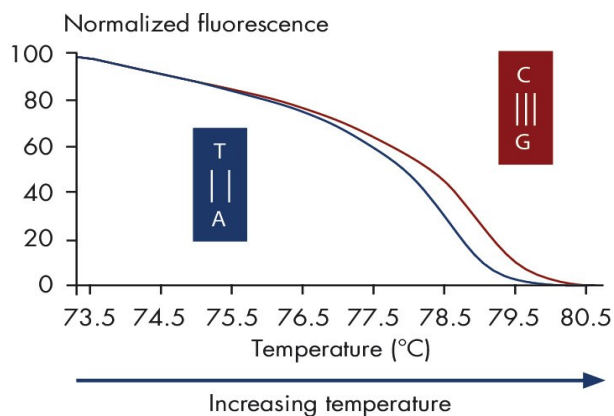
Die HRM Analyse basiert auf dem Dissoziationsverhalten von doppelsträngigen DNA-Molekülen (dsDNA). Mit steigender Temperatur trennen sich Wasserstoffbrückenbindungen sowie alle weiteren Bindungen auf und die DNA trennt sich in zwei Einzelstränge auf, sie ‚schmilzt‘. Das Schmelzverhalten von dsDNA hängt dabei unter anderem von der Länge des DNA-Amplicons sowie ihrem Gehalt an G- und C-Basen ab, so schmelzen AT-reiche Regionen schneller (31).

Bei der HRM-PCR wird zunächst durch Amplifizierung ein PCR-Produkt generiert, welches anschließend einem graduellen Temperaturanstieg ausgesetzt wird. Dies geschieht in Anwesenheit eines interkalierenden Farbstoffes, dem *EvaGreen® fluorescent dye*, welcher in einem an dsDNA gebundenen Zustand fluoresziert. Diese Fluoreszenz wird kontinuierlich gemessen und gegenüber der Temperatur aufgetragen, womit sich die typische HRM-Kurve ergibt (siehe *Abb. 15*). Sobald die dsDNA aufgrund steigender Temperatur schmilzt, löst sich der Farbstoff und die Fluoreszenz sinkt. Die Schmelztemperatur der DNA ist dabei definiert als der Zeitpunkt der größten Änderung der Fluoreszenz (31).



**Abbildung 15: Schmelzverhalten von dsDNA (31)**

Die durch einzelne Mutationen, z.B. SNPs, verursachten Sequenzänderungen in der Basenabfolge, wirken sich auf die Stabilität der DNA aus, das heißt auf deren Schmelzverhalten, was durch die HRM-Analyse aufgrund der extrem hohen Sensitivität nachgewiesen werden kann (43). Eine beispielhafte Schmelzkurve zweier DNA-Proben ist in Abbildung 16 zu sehen: die linke blaue DNA hat eine zweifache T-A-Bindung statt einer dreifachen C-G-Bindung wie die rote Probe. Sie ist somit weniger hitzestabil und schmilzt früher.



**Abbildung 16: Schmelzverhalten zweier DNA-Proben (31)**

SNPs werden in vier Klassen unterteilt, abhängig von der Art der Basenveränderung. So hat ein einfacher Austausch von A zu einem T einen sehr geringen Einfluss auf die Schmelztemperatur ( $<0,2^\circ\text{C}$ ). Einen solchen, schwierig zu detektierenden A/T Shift bezeichnet man als Klasse IV SNP, welcher aber ebenfalls von dem hier verwendeten *HRM Type-it Kit* von Qiagen® detektiert werden kann (31).

Weitere Vorteile der HRM-PCR sind die einfache Handhabbarkeit, der Verzicht auf ein kompliziertes Post-Amplifikationsprocedere, wie etwa Chromatographie oder Polyacrylamid-Gelelektrophorese. Ebenso ist die HRM-PCR ein geschlossenes Verfahren, welches es erlaubt, sowohl Amplifikation als

auch die Messung im selben Instrument durchzuführen, und weist zudem minimales Kontaminationsrisiko für das Amplikon auf (44). Darüber hinaus können durch das sorgfältige Aussuchen von passenden Amplikonen, mehrere SNPs in einem Ansatz untersucht werden. Dies bezeichnet man als Multiplexen.

## Primer Design

Zur Ermöglichung der HRM-PCR müssen spezifische Primer für die jeweiligen SNPs entworfen werden. Primer sind Oligonukleotide, die den Anfangs- und Endpunkt der DNA-Polymerase festlegen. Für jeden zu untersuchenden SNP werden dementsprechend zwei Primer benötigt, ein *forward* Primer sowie ein *reverse* Primer. Die Primer sollten dabei eine Länge zwischen 18-30 Basenpaaren (bp), möglichst wenig repetitive Sequenzen sowie eine Schmelztemperatur ( $T_m$ ) von ca. 60°C haben. Der Guanin- und Cytosin-Gehalt (GC-Gehalt) sollte möglichst gleich sein und mindestens 40% betragen. Das entsprechende, durch die Primer festgelegte Amplikon sollte zwischen 80-100 bp groß sein und eine  $T_m$  von 80-90°C haben. Die Schmelztemperatur berechnet sich durch folgende Formel (45):

$$T_m = 2^\circ\text{C} \times (\text{Anzahl von [A + T]}) + 4^\circ\text{C} \times (\text{Anzahl von [G + C]}).$$

Mithilfe des *Illumina Variant Studios* werden aus dem *vcf file* der untersuchten Proben geeignete SNPs gewählt. Diese sollten möglichst eine Allelfrequenz von 20-50% haben, um eine gute Detektionsrate der Variante zu erreichen. Die genomischen Sequenzen der Gene, in denen die ausgewählten SNPs lokalisiert sind, werden anhand der *LRG Database*<sup>11</sup> und der genspezifischen NM-Nummer herausgesucht. Das *Primerdesign* erfolgte bei der Etablierung der Methode mithilfe des Programms *NCBI Primer Blast* des *National Center for Biotechnology Information*<sup>12</sup>. Wichtig dabei war, dass die vier Amplifikate, welche in einem HRM Ansatz kombiniert werden sollten, jeweils unterschiedliche  $T_m$  aufwiesen, um die vier SNPs später in der HRM-PCR differenzieren zu können. Durch Überprüfen im *ENSEMBLE* Programm<sup>13</sup> konnte ausgeschlossen werden, dass weitere SNPs in der ausgewählten Sequenz vorlagen. Die entworfenen Primer wurden bei der Etablierung durch die Firma *euofins Genomics*<sup>®</sup> synthetisiert. Im Anhang (Tabelle 31) sind die für die molekulargenetischen Untersuchung verwendeten Primer aufgeführt.

---

<sup>11</sup> <https://www.lrg-sequence.org/index.html>

<sup>12</sup> <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

<sup>13</sup> <http://www.ensembl.org>

## HRM-PCR Ansatz

Die lyophilisierten Primer wurden in einer individuellen Menge TE-Puffer gelöst, bis sie in einer Konzentration von 100 pmol/ $\mu$ l vorlagen. Anschließend wurden nach einem Tag Wartezeit je 10  $\mu$ l *forward*- und *reverse*-Primer miteinander vermischt sowie mit 80  $\mu$ l Wasser auf eine Konzentration von 10 pmol/ $\mu$ l je Primerpaar verdünnt.

Für die HRM-PCR sind die zu untersuchenden DNA, der vorbereitete Primer-Mix, RNase freies Wasser und der HRM-PCR *Master Mix* aus dem *HRM Type-it Kit* von Qiagen<sup>®</sup> notwendig. Der HRM-PCR Mastermix enthielt *HotStarTaq<sup>®</sup> Plus* DNA-Polymerase, *Type-it HRM Buffer* mit *EvaGreen<sup>®</sup>* Farbstoff, *Q-Solution<sup>®</sup>* (für eine erfolgreiche Amplifikation) und die vier dNTPs (45). Die genaue Reaktionszusammensetzung je Reagenztube ist in Tabelle 18 dargestellt.

**Tabelle 18: HRM PCR-Ansatz**

Reagenz	Volumen in $\mu$ l
DNA	2
RNase freies Wasser	8,75
Primer Mix	1,75
HRM PCR Master Mix	12,5
Endvolumen	25

Jede zu untersuchende Probe ist pro HRM-Run doppelt anzusetzen. Zudem sollten zum Ausschluss von Kontaminationen zwei *No-Template-Control*'-Proben (NTC) angesetzt werden, welche statt DNA 2  $\mu$ l RNase freies Wasser enthalten. Nach Abschluss des manuellen Pipettiervorgangs wurden die *tubes* in den *RotorGene<sup>®</sup>* gestellt und das Programm entsprechend den Vorgaben gestartet (45). Das genaue Protokoll ist in Tabelle 19 ausgeführt.

**Tabelle 19: Protokoll des HRM-PCR Programms**

Arbeitsschritt	Zeitdauer	Temperatur
Initiale PCR-Aktivierung	5 min	95 °C
3-Schritt-Zyklus (40x):		
- Denaturierung	10 s	95°C
- Primerhybridisierung	30 s	55°C
- Amplifizierung	10 s	72°C
HRM	2 s	65° – 95°C, mit 0,1°C Anstieg pro Sekunde

Anschließend kann das Schmelzverhalten der untersuchten DNA-Proben mithilfe der Fluoreszenz-Graphen untersucht werden und dadurch auf das Vorliegen eines SNP geschlossen werden. Solche Graphen sind beispielweise in Abbildung 17 zu sehen.

### 2.3.11 Untersuchte SNPs in der HRM-PCR

Für die Etablierung der HRM-PCR wurden SNPs in den Genen *DES*, *KCNH2*, *MYH6*, *MYH7*, *GAA* und *AKAP9* ausgewählt (vgl. Tabelle 20). Generell kann für die etablierte Methode doch auch jede andere Kombination von SNPs bzw. Primern gewählt werden, sofern die im Kapitel 2.3.10 beschriebenen Kriterien zutreffen. Im Folgenden wird beispielhaft der Ablauf während der Etablierung erläutert.

Die für die Etablierung der Methode ausgewählten SNPs wiesen alle eine MAF (engl. *minor allele frequency*) von 20-35% auf. Die MAF ist die Frequenz des selteneren Allels, mit der es in einer Population auftritt. Genauere Details zu den SNPs sind in Tabelle 20 nachzulesen. Die dort angegebene rs-Nummer dient der Spezifizierung der SNPs, die NM Nummer kennzeichnet die Gen-Isoform der ‚Reference Sequence‘ Datenbank des ‚National Center for Biotechnology Information‘ (NCBI). Die MAF ist dabei nach gnomAD-Informationen angegeben.

**Tabelle 20: Ausgewählte SNPs für die HRM-PCR**

Gen	NM- Nummer	Position der Base	Basenaus- tausch	rs- Nummer	MAF (in %)	Länge Amplifikat (in bp)	T <sub>m</sub>
DES	001927.3	c.828	C>T	1058261	34,2	92	87°C
KCNH2	000238.3	c.1539	C>T	1805120	20,3	115	91°C
MYH7	000257.2	c.2967	A>G	7157716	30,7	115	89°C
MYH6	002471.3	c.3302	A>G	365990	33,3	72	84 °C
GAA	000152.3	c.2133	A>G	1800310	31,6	100	85.6°C
AKAP9	005751.4	c.9145	C>T	28927678	41,25	149	77°C
AKAP9	005751.4	c.8375	A>G	6960867	38,73	156	79°C
KCNH2	000238.3	c.1467	C>T	740952	23,2	88	83,4°C

*T<sub>m</sub>* = Schmelztemperatur, *bp* = Basenpaare. Der breite Strich trennt dabei den ersten Ansatz vom Zweiten.

Die T<sub>m</sub> bezeichnet die Temperatur, bei welcher der vervielfältigte DNA-Bereich zu ‚schmelzen‘ beginnt. Für das Experiment war es wichtig, dass sich die verschiedenen Schmelztemperaturen der Amplifikate ausreichend unterscheiden, um später je vier SNPs in einem *Multiplex*-Ansatz untersuchen zu können. Bei einer Überprüfung mit nur vier SNPs besteht eine Wahrscheinlichkeit von 71% (s. mathematische Erläuterungen Kapitel 2.3.12), dass von den zehn Proben mindestens zwei Proben die gleiche Genotyp-Kombination aufweisen und somit nicht voneinander differenzierbar sind. Daher sollte eine Analyse von insgesamt acht SNPs (in zwei Ansätzen) erfolgen.

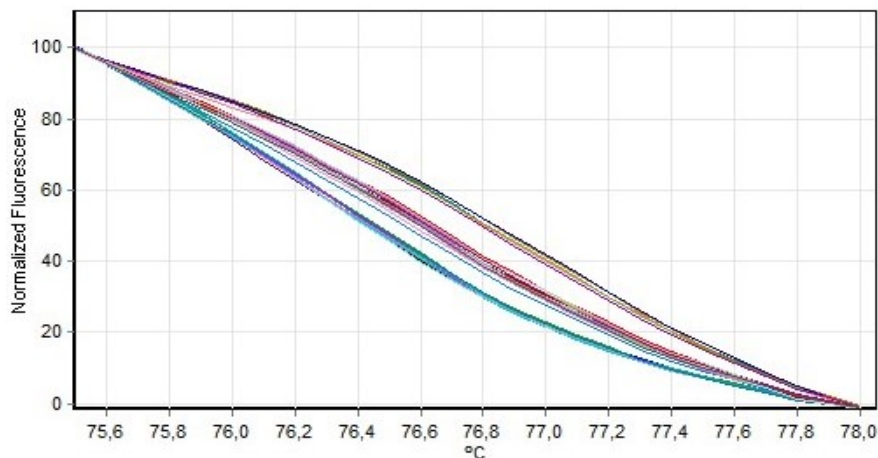
Für die HRM-Analytik wurden zunächst DNA-Proben von Patienten mit bekanntem Genotyp in Bezug auf den zu untersuchenden SNP (homo-, heterozygot oder Wildtyp) mithilfe des *Qubit*<sup>®</sup> auf eine Konzentration von 5,5 ng/μl eingestellt. Als Negativ-Kontrolle wurde eine Wasserprobe eingesetzt. Die Analyse einer jeden Probe erfolgte als Doppelbestimmung. Das verwendete HRM-PCR Programm ist in Kapitel 2.3.10 in Tabelle 19 aufgelistet.

Die Etablierung der *Multiplex*-HRM erfolgte schrittweise, in dem eine HRM-Analyse nach der nächsten in den PCR-Ansatz integriert wurde. Durch das schrittweise Vorgehen konnte sichergestellt werden, dass die Amplifikate miteinander kompatibel waren und sich in ihren Schmelzpunkten ausreichend unterschieden. So wurde zunächst ein erster Durchlauf mit einem Amplifikat allein durchgeführt, um unter anderem die Funktionsfähigkeit der Primer zu prüfen.

Stellen sich die drei verschiedenen Allelzustände (WT, HOM, HET) eines SNP (mehrfach) nicht in der HRM-PCR dar, so kann mittels einer manuellen PCR (Vorgehensweise s. Kapitel 2.3.8) die Funktion der Primer überprüft werden. Ist auch mit dieser Methode keine Lösung des Problems möglich, so ist das Primerpaar (und ggf. auch der SNP) zu verwerfen und ein neues Primerpaar zu designen.

Sofern die HRM-PCR eines SNPs zufriedenstellend verläuft, kann ein zweiter SNP in die Analyse mitaufgenommen werden. Schließlich kann eine HRM-PCR mit Primern für alle vier SNPs durchgeführt werden, sodass eine simultane Analyse möglich ist. Gleichzeitig werden hierbei die Kontrollproben etabliert, welche später notwendig sind, um die Genotypen zuzuordnen. Um alle drei möglichen Genotypen der vier Gene zweifach abzudecken, waren für die Etablierung der Methode sieben Kontrollproben mit bereits bekannten Genotypen notwendig. Diese Kontrollproben sind samt Genotyp im Anhang aufgelistet (Tabelle 32, Seite VI).

Sofern alle Proben visuell sowie rechnerisch durch den Computer demjenigen Genotyp zugeordnet werden können, welcher auch in der *MiSeq*<sup>®</sup>-Analyse festgestellt wurde, ist die Etablierung erfolgreich abgeschlossen. Eine beispielhafte Darstellung der normalisierten Fluoreszenz-Kurve des Etablierungslaufs ist in Abbildung 17 zu sehen.



**Abbildung 17: Multiplex-HRM-PCR**

### **2.3.12 Mathematische Grundlage des Verfahrens**

Im Rahmen der Verfahrensetablierung sollte berechnet werden, mit welcher Sicherheit das Methodendesign eine Probenverwechslung detektieren würde bzw. eine solche ausgeschlossen werden kann. Diese Sicherheit wird im Folgenden als *Design Accuracy* bezeichnet.

Im ersten Schritt wurden die Wahrscheinlichkeiten für das Auftreten der einzelnen Allelkombinationen berechnet. Diese Wahrscheinlichkeit ergibt sich aus den Häufigkeiten der Genotypen. Die Daten diesbezüglich entstammen den Angaben von *NCBI*, genauer gesagt wurden die Daten der *HapMap-CEU European Population* verwendet. Für den SNP rs1800310 waren keine Daten in dieser Population verfügbar, weshalb die Daten des *AFD\_EUR\_PANEL* genutzt wurden. Für den SNP rs28927678 (AKAP9) wurden die Daten der *CS Agilent-Population*, einer ebenfalls europäischen Population, verwendet. In der Tabelle 21 sind die einzelnen Allelfrequenzen aufgelistet. Die MAF ist dabei nach *gnomAD*-Informationen angegeben.

**Tabelle 21: Allelfrequenzen der untersuchten SNPs**

	Allelfrequenz des Wildtyps (WT)	Allelfrequenz des heterozygoten Genotyps (HET)	Allelfrequenz des homozygoten Genotyps (HOM)	MAF ( <i>minor allele frequency</i> )
<b>KCNH2</b> rs1805120	0,646	0,301	0,053	0,203
<b>MYH7</b> rs71457716	0,474	0,439	0,009	0,307
<b>MYH6</b> rs365990	0,467	0,400	0,133	0,333
<b>DES</b> rs1058261	0,432	0,450	0,117	0,342
<b>GAA</b> rs1800310	0,421	0,526	0,053	0,316
<b>KCNH2</b> rs740952	0,5883	0,359	0,052	0,232
<b>AKAP9</b> rs28927678	0,354	0,46700004	0,1790001	0,4125
<b>AKAP9</b> rs6960867	0,36936936	0,48648649	0,14414415	0,38738739

Jede mögliche Kombination ergibt sich als Produkt der Einzelwahrscheinlichkeiten, die Berechnung erfolgte folglich durch Multiplikation der einzelnen Allelfrequenzen. So besteht zum Beispiel die Wahrscheinlichkeit, dass eine Probe achtmal den Wildtyp in allen acht SNPs aufweist, ungefähr bei:

$$P_{WT,WT,WT,WT,WT,WT,WT,WT} \approx 0,646 * 0,4741 * \dots * 0,36936936 \approx 0,002 = 0,2\% .$$

Im zweiten Schritt wurde die Wahrscheinlichkeit berechnet, dass von einer bestimmten Anzahl  $n$  von Proben genau  $k$  Proben die gleiche Genotypen-Kombination aufweisen. Die Anzahl der zu testenden Proben wurde auf  $n=10$  festgelegt, da auch dies die Anzahl an Proben eines *MiSeq*<sup>®</sup>-Runs sind. Mithilfe



folgender Formel wurde berechnet, wie hoch die Wahrscheinlichkeit ist, dass bei einer bestimmten Genotypen-Kombination genau  $2 \leq k \leq 10$  Proben gleich sind:

$$P_{x;k} = p_x^k * (1 - p_x)^{(n-k)} * \frac{n!}{k! * (n - k)!}$$

So besteht zum Beispiel die Wahrscheinlichkeit, dass bei 10 Proben genau 2 Proben achtmal den Wildtyp in allen acht SNPs aufweisen ungefähr bei:

$$P_{WT,WT,WT,WT,WT,WT,WT,WT;2} \approx 0,002^2 * (1 - 0,002)^{10-2} * \frac{10!}{2! * (10 - 2)!} \approx 0,00018 = 0,018\%$$

Im dritten Schritt wurden die Wahrscheinlichkeiten, dass bei einer bestimmten Genotypen-Kombination genau  $2 \leq k \leq 10$  Proben gleich sind, zusammengerechnet:

$$P_x = P_{x;2} + P_{x;3} + \dots + P_{x;10}$$

So besteht zum Beispiel die Wahrscheinlichkeit, dass bei 10 Proben mindestens 2 Proben achtmal den Wildtyp in allen acht SNPs aufweisen ungefähr bei:

$$P_{WT,WT,WT,WT,WT,WT,WT,WT} \approx 0,00018 + 0,000000946 + \dots \approx 0,00018 \approx 0,018\%$$

Im vierten Schritt wurde der Umkehrschluss aus der vorherigen Berechnung gezogen. Wenn die Wahrscheinlichkeit, dass bei zehn Proben mindestens zwei Proben achtmal den Wildtyp in allen SNPs aufweisen ungefähr bei 0,018% liegt, dann liegt die Wahrscheinlichkeit, dass bei zehn Proben keine Probe doppelt vorkommt, die achtmal den Wildtyp in allen acht SNPs aufweist, ungefähr bei

$$1 - 0,00018 = 0,99982 = 99,982\%.$$

Bei drei Ausprägungsmöglichkeiten von acht SNPs ergeben sich insgesamt  $3^8 = 6561$  Möglichkeiten. Von jeder dieser einzelnen Genotypen-Kombination wurde mithilfe von Microsoft Excel® die Schritte eins bis vier berechnet und somit die einzelnen Wahrscheinlichkeiten, dass bei zehn Proben keine Probe der jeweiligen Genotyp-Kombination doppelt vorkommt.

Im letzten Schritt wurden die 6561 Wahrscheinlichkeiten, dass keine Probe der jeweiligen Genotyp-Kombination doppelt vorkommt, multipliziert. Somit ergibt sich die Gesamtwahrscheinlichkeit, dass bei zehn Proben keine Probe doppelt vorkommt. Diese liegt bei ungefähr 95,15% und entspricht als *Design Accuracy* der Methode.

## 3. Ergebnisse

### 3.1 Identifizierung von kausalen Genmutationen

Ein Ziel dieser Arbeit war es, die genetische Ursache der arrhythmogenen unklassifizierten Kardiomyopathie (AUCM) zu identifizieren. Dafür wurden 57 AUCMPatienten mittels Hochdurchsatzsequenzierung (*Next-Generation sequencing*; NGS) mit dem Genpanel ‚*TruSight Cardio*‘ auf Mutationen in 174 kardial-relevanten Genen hin untersucht. Diese 174 untersuchten Gene sind im Anhang aufgeführt. Für 14 dieser DNA-Proben wurden sowohl die Präparation der Sequenzier-Bibliotheken als auch die Auswertung der Sequenzdaten eigenständig durchgeführt. Für die statistische Auswertung der Prävalenz von Genmutationen in verschiedenen Krankheitsgenen wurden nachfolgend auch die Analyseergebnisse von 43 weiteren Patienten miteinbezogen.

#### 3.1.1 Sequenzierung und Datenauswertung bei 14 AUCM Patienten

Die 14 AUCM Patienten wurden in zwei Sequenzierlibraries analysiert. Pro Probe wurden ca. zwei Millionen Sequenzen (*reads*) generiert, von denen 99.8% gegen die zu analysierenden Genabschnitte *aligned* werden konnten. Die durchschnittliche Abdeckung (*coverage*)/Target lag bei 325 x und weniger als 1% der Exone des Genpanels wurden mit einer durchschnittlichen „*coverage*“ von <20 x sequenziert. Die durchschnittliche *Coverage* sollte generell mindestens 200 x betragen bei einer empfohlenen minimalen *Coverage* von 20 x. Um bei den Ergebnissen potenziell pathogene von nicht-pathogenen Varianten differenzieren zu können, wurden die detektierten Sequenzvariationen zunächst nach definierten Kriterien gefiltert. Anschließend erfolgte eine weitere Differenzierung der verbleibenden Varianten.

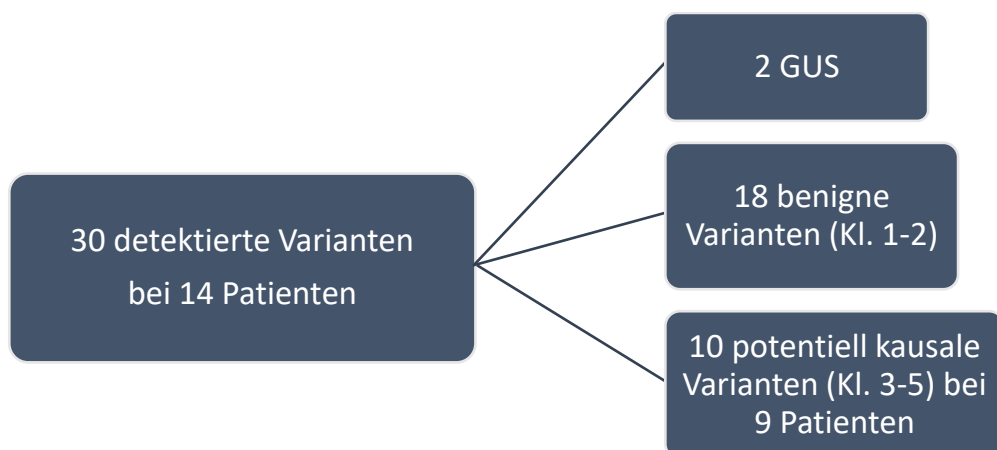
Die Validität einer detektierten Variante wird durch zwei Qualitätswerte, den *Quality Filter* und den *Quality Score*, beschrieben. Für die weitere Analyse wurden nur Varianten berücksichtigt, welche das Qualitätskennzeichen des ‚*PASS*‘-Filters aufwiesen, um die Wahrscheinlichkeit falsch-positiver Varianten zu reduzieren. Darüber hinaus wurden von diesen Sequenzvarianten nur solche in die weitere Analyse aufgenommen, welche auch eine Veränderung auf Ebene der Aminosäuren verursachen, sowie in Kontrollpopulationen (*gnomAD*) nicht oder nur sehr selten ( $MAF < 0,05\%$ ) vorkommen.

Bei den 14 eigens analysierten Patienten wurden insgesamt 30 Varianten in 24 verschiedenen Genen herausgefiltert, die die oben aufgeführten Kriterien aufwiesen und welche anschließend auf ihre Relevanz für die Erkrankung hin beurteilt wurden. Die weitere Beurteilung der herausgefilterten Varianten erfolgte gemäß den *ACMG guidelines* unter Berücksichtigung der Ergebnisse von *online prediction tools*, welche eine Prognose bezüglich der Pathogenität einer genetischen Veränderung berechnen, sowie mithilfe von Datenbanken, wie *HGMD*<sup>®</sup> oder *ClinVar*<sup>®</sup>. Letztere liefern Informationen darüber, ob eine Genvariante bereits beschrieben wurde. Im Folgenden wird die Auswertung der 14 eigenen Patienten detailliert erläutert.

### 3.1.2 In silico – Analyse der Pathogenität

Nach aktuellen Richtlinien der *ACMG* werden fünf Klassen von Sequenzvarianten unterschieden. So werden Klasse 4 und Klasse 5 Varianten als pathogen bezeichnet (vormals ‚Mutation‘), wohingegen Varianten der Klasse 1 und 2 als Polymorphismen bezeichnet werden. Darüber hinaus gibt es Klasse 3 Varianten, welche als ‚variant of uncertain significance‘, kurz *VUS*, bezeichnet werden. Diese können nicht eindeutig den Klasse 1 und 2 bzw. 4 und 5 zugeordnet werden, da nicht genügend Informationen für diese Varianten vorliegen, oder sie nach derzeitigen Forschungsstand kontrovers bezüglich ihrer Pathogenität beurteilt werden (7).

Bei den 14 eigens sequenzierten Patienten fanden sich insgesamt 30 potentiell-kausale Varianten, wovon zehn Varianten aufgrund weiterer Einschätzungen (s. unten) näher untersucht wurden. Bei zwei detektierten Varianten handelte es sich um *genes of uncertain significance* (*GUS*), diese wurden nicht weiter berücksichtigt. 18 Varianten wurden den Klassen 1 und 2 zugeordnet und daher nicht weiter untersucht. Diese Ergebnisse sind in Abb. 18 dargestellt.



**Abbildung 18: Übersicht über detektierte Varianten bei den 14 eigenständig analysierten Patienten**

Im Folgenden wird die in silico-Analyse der Varianten detailliert erläutert. Für die Einteilung der 30 identifizierten Varianten in die ACMG Klassen, erfolgte zunächst die Differenzierung anhand der Einschätzung durch vier unterschiedliche Pathogenitätsvorhersageprogramme (*PolyPhen*, *SIFT*, *Mutation Taster* sowie *SNP& Go*, *VarCards*). In der untenstehenden Tabelle 22 sind die 30 detektierten Genvarianten der AUCM-Patienten sowie die Ergebnisse der Online Pathogenitätsvorhersageprogramme (sog. *Prediction-Tools*) aufgelistet. Für eine bessere Übersicht sind die Patienten (samt den bei ihnen detektierten Varianten) abwechselnd blau und grün eingefärbt. Die zehn Varianten, die sich als potentiell pathogen herausstellten und weiter untersucht wurden, sind zudem rot eingefärbt.

**Tabelle 22: Detektierte Varianten (MAF<0.05%, mit Effekt auf Proteinebene)**

Proben-ID	Genvariante	PolyPhen	SIFT	Mutation Taster	SNP& Go	VarCards Algorithmus
11129-3	<b>KCNJ2</b> c.244C>T p.(Arg82Trp)	probably damaging	deleterious	disease causing	Mutation	22:23
12083-1	<b>SCN5A</b> c.5350G>C p.(Glu1784Gln)	probably damaging	deleterious	disease causing	neutral	21:23
	KCNH2 c.2860C>G p.(Arg954Gly)	probably damaging	deleterious	disease causing	neutral	14:23
	TAZ c.222C>A p.(Asp74Glu)	benign	deleterious	disease causing	neutral polymorphism	20:23
	APOB c.5387C>G p.(Thr1796Ser)	benign	tolerated	polymorphism	neutral polymorphism	2:23
12336-1	<b>TTN</b> c.47884_47887dup p.(Met5963Asnfs*8)	-	-	-	-	n.b. <sup>14</sup>
	HCN4 c.3103C>G p.(Pro1035Ala)	benign	tolerated	polymorphism	neutral polymorphism	5:22
	MYLK c.3902G>T p.(Arg1301Leu)	probably damaging	tolerated	disease causing	neutral polymorphism	11:22
	SLC2A10 c.1162C>T p.(Arg388Trp)	benign	deleterious	polymorphism	neutral	4:23
12260-1	<b>LAMA4</b> c.4405G>A p.(Ala1469Thr)	probably damaging	deleterious	disease causing	neutral	12:23
	TTN c.42925A>G p.(Lys14309Lys)	-	-	polymorphism	-	9:22
	COX15 c.452C>G p.(Ser151Ter)	-	-	-	GUS	12:12

<sup>14</sup> n.b. = nicht beurteilbar. Die Prediction-Programme eignen sich v.a für die Einschätzung von Aminosäure-Substitutionen.

12260-1	MYH11 c.5818G>A p.(Glu1940Lys)	benign	deleterious	disease causing	-	13:23 <sup>15</sup>
12343-1	MYH7 c.1633G>A p.(Asp545Asn)	probably damaging	deleterious	disease causing	disease	17:22
	ALMS1 c.6520G>A p.(Ala2174Thr)	benign	deleterious	-	GUS	9:20
12314-1	LMNA c.568C>T p.(Arg190Trp)	probably damaging	deleterious	disease causing	disease	22:23
	TTN c.83600C>G p.(Pro27867Arg)	-	-	disease causing	-	18:22
12644-1	TTN c.91621G>A p.(Gly28900Arg)	-	-	-	-	19:22
	LAMA2 c.3290A>G p.(His1097Arg)	probably damaging	tolerated	polymorphism	neutral	13:23
12421-1	RYR2 c.2444C>T p.(Pro815Leu)	probably damaging	deleterious	disease causing	disease	18:23
	FBN2 c.1990A>T p.(Thr664Ser)	probably damaging	deleterious	disease causing	neutral	20:23
	PKP2 c.1742G>A p.(Gly581Glu)	probably damaging	deleterious	disease causing	disease	19:23
10915-3	KCNH2 c.2833G>T p.(Gly945Cys)	benign	deleterious	polymorphism	neutral	12:23
	NOTCH1 c.6391G>T p.(Gly2131Cys)	possibly damaging	deleterious	polymorphism	neutral	6:23
	RYR1 c.11359+6 _11359+7delCC p.=	Intron Variante, wodurch die Splice Site nach Angabe von Prediction Programmen noch eher erkannt wird				
	DSG2 c.828_828+2delGGT p.(Glu278Lysfs*11)	- <sup>16</sup>	-	disease causing	-	n.b.
1616-1	TTN c.2075del p.(Lys692Arg fs*11)	-	-	-	-	n.b.
	PCSK9 c.1503G>A p.=	Intron Variante, wodurch die Splice Site nach Angabe von Prediction Programmen noch eher erkannt wird				
	MYO6 c.2818C>T p.(Arg940Cys)	possibly damaging	deleterious	disease causing	neutral	14:23
12332-1	TTN c.39089C>T p.(Ala13030Val)	-	-	-	-	0:21

<sup>15</sup> Wahrscheinlich nicht-kausal, da Prediction Programme eine verbesserte Lesbarkeit der upstream-splice site vorsagen.

<sup>16</sup> PolyPhen eignet sich nur für die Einschätzung von Aminosäure-Substitutionen.

Bei der weiteren Analyse wurden alle Varianten in Genen, die bereits mit Arrhythmien oder Kardiomyopathien assoziiert waren und eine überwiegend schädigende Prognose (*VarCards* >15:>20 oder *frame-shift* Mutationen) zeigten, genauer klassifiziert. Diese Varianten sind in der obigen Tabelle 22 rot markiert und werden in Tabelle 23 weiter klassifiziert. Ausgenommen waren Basensubstitutionen in *TTN*, da in diesem Gen hauptsächlich Abbruchmutationen als pathogene Varianten bekannt sind. Ebenso wurden alle Varianten, die überwiegend als benigne eingeschätzt wurden und/oder einen *VarCards*-Algorithmus von <15:<20 hatten sowie *GUS* nicht berücksichtigt. Sofern eine vermutliche Mutation bei einer Probe detektiert werden konnte, wurden wahrscheinlich irrelevante Varianten unklarer Signifikanz nicht weiter untersucht. So wurde bei der Probe 12083-1 die *KCNH2*-Variante sowie bei der Probe 12421-1 die *FBN2*-Variante nicht weiter berücksichtigt, da jeweils eine andere Variante derselben Probe als wahrscheinlicher kausal bewertet wurde.

In 5 von 14 Proben konnte keine wahrscheinlich kausale bzw. möglicherweise kausale Genmutation identifiziert werden. Bei den weiteren neun Proben wurden zehn potenziell kausale Genvarianten detektiert (ein Patient war Träger von zwei potentiell schädigenden Genvarianten). Bei zwei Kindern eines Patienten, bei welchem im Rahmen der *MiSeq*<sup>®</sup>-Analyse eine *RYR2*-Mutation aufgefallen war, zeigte sich durch die Sanger-Sequenzierung diese Mutation bei dem Sohn heterozygot, wohingegen die Tochter des Indexpatienten in beiden Allelen die Wildtyp Variante aufwies.

Zusammenfassend wurden bei den 14 eigens analysierten Patienten insgesamt 30 Varianten detektiert, wobei es sich bei fünf von ihnen um Polymorphismen oder benigne Varianten der Klasse 1 handelte.<sup>17</sup> Darüber hinaus wurden 13 Varianten als a.e. irrelevant, d.h. als Klasse 2 Varianten, klassifiziert.<sup>18</sup> Ebenso fanden sich zwei Varianten in Genen unklarer Signifikanz.<sup>19</sup> Bei neun Patienten wurden insgesamt zehn potenziell kausale Mutationen, d.h. Veränderungen der Klasse 3 - 5, gefunden. Im Folgenden werden diese zehn Basenvarianten, die sich in der ersten Analyse als möglicherweise kausal (Klasse 3-5) darstellten, bewertet und interpretiert sowie mit dem klinischen Phänotyp des Patienten in Beziehung gesetzt.

---

<sup>17</sup> *APOB* c.5387C>G von 12083-1, *HCN4* c.3103C>G von 12336-1, *LAMA2* c.3290A>G von 12644-1, *RYR1* c.11359+6 von 10915-3, *PCSK9* c.1503G>A von 1616-1

<sup>18</sup> *KCNH2* c.2860C>G und *TAZ* c.222C>A von 12083-1, *MYLK* c.3902G>T und *SLC2A10* c.1162C>T von 12336-1, *TTN* c.42925A>G und *MYH11* c.5818G>A von 12260-1, *TTN* c.83600C>G von 12314-1, *TTN* c.91621G>A von 12644-1, *FBN2* c.1990A>T von 12421-1, *KCNH2* c.2833G>T und *NOTCH1* c.6391G>T von 10915-3, *MYO6* c.2818C>T von 1616-1, *TTN* c.39089C>T von 12332-1

<sup>19</sup> *COX15* c.452C>G und *ALMS1* c.6520G>A

### 3.1.2 Beurteilung der Pathogenität der Sequenzvarianten

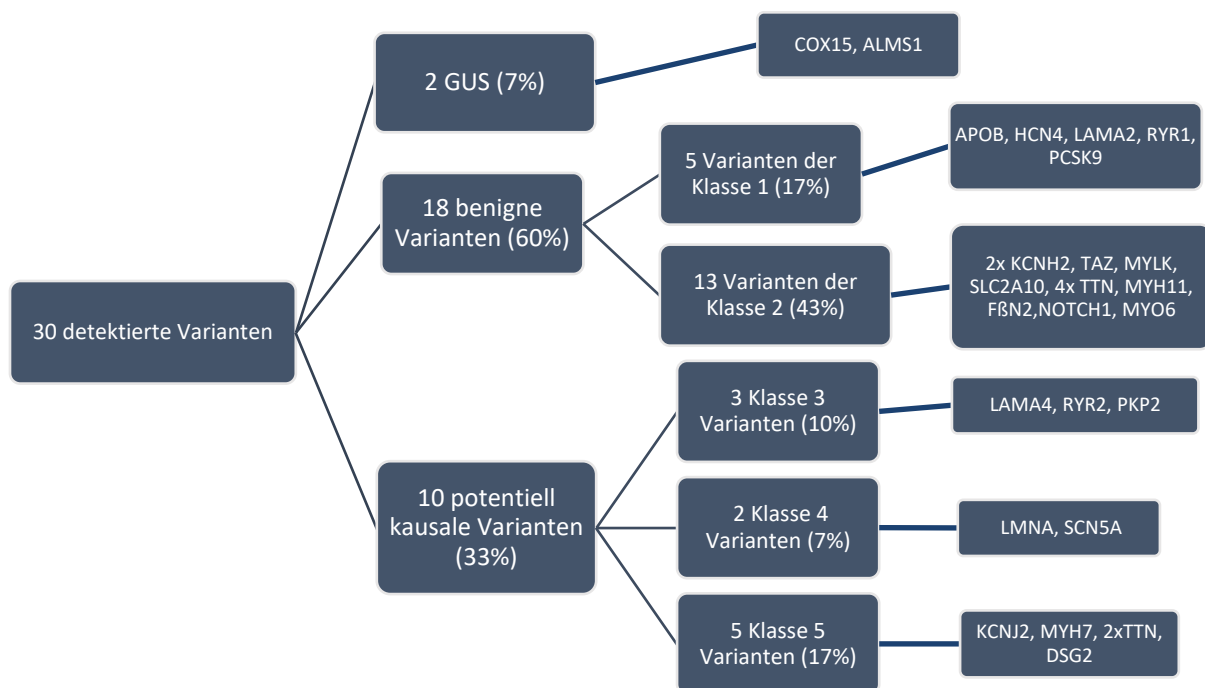
Nachdem in der obigen Tabelle 22 die grobe Einschätzung der Varianten bezüglich ihrer Pathogenität mithilfe der *Prediction-Tools* erfolgt war, wurden die möglicherweise kausalen Varianten anhand der Kriterien der ACMG weiter untersucht und in eine der fünf ACMG-Klassen eingeteilt. Hierfür wurde berücksichtigt, in wieweit nicht-synonyme Austausche bei dem Protein als natürliche Varianz vorkommen (z-score), ob die identifizierte Veränderung bereits als Krankheitsgen für arrhythmische Kardiomyopathien beschrieben wurde, mit welcher Häufigkeit die Variante in großen Kontrollpopulationen (*gnomAD*) vorkommt und ob sie von den Vorhersageprogrammen mehrheitlich als pathogen eingestuft wird. Das Ergebnis dieser Analyse ist in Tabelle 23 zu sehen.

**Tabelle 23: Einschätzung der Pathogenität unter Berücksichtigung der Pathogenitätsvorhersageprogramme, der Häufigkeit in Vergleichspopulationen sowie den Einträgen in Datenbanken**

Probe	Variante	Var-Cards	Bekannt in Datenbanken	MAF in <i>gnomAD</i>	Z-Score des Gens	ACMG-Klasse
11129-3	KCNJ2 c.244C>T p.(Arg82Trp)	22:23	X (HGMD, LMSD; pubmed-ID: 16818210, 23631430)	unbekannt	3,02	<b>KI. 5</b>
12343-1	MYH7 c.1633G>A p.(Asp545Asn)	17:22	X (HGMD, LSMD; pubmed-ID: 17947214)	<i>gnomAD</i> : MAF von 0,0008%	6,54	<b>KI. 5</b>
12336-1	TTN c.47884_ 47887dup p.(Met15963Asnfs*8)	-	-	unbekannt	-	<b>KI. 5</b>
1616-1	TTN c.2075del p.(Lys692ArgfsTer11)	-	-	unbekannt	-	<b>KI. 5</b>
10915-3	DSG2 c.828_828+2del p.(Glu278Lysfs*11)	-	x (dbSNP: rs786204292)	dbSNP: 0.00003312%	-	<b>KI. 5</b>
12314-1	LMNA c.568C>T p.(Arg190Trp)	22:23	X (HGMD; pubmed-ID: 11897440, 22199124, 23701190 u.a.)	unbekannt	3,37	<b>KI. 4</b>
12083-1	SCN5A c.5350G>C p.(Glu1784Gln)	21:23	-	unbekannt	2,53	<b>KI. 4</b>
12260-1	LAMA4 c.4405G>A p.(Ala1469Thr)	12:23	X (dbSNP: rs727504595)	<i>gnomAD</i> : 0,017%	-0,67	<b>KI. 3</b>
12421-1	RYR2 c. .2444C>T p.(Pro815Leu)	18:23	x (dbSNP: rs537596448)	<i>gnomAD</i> : 0,0032% ALL 0,0067% NFE	5,21	<b>KI. 3</b>
	PKP2 c.1742G>A p.(Gly581Glu)	19:23	x (dsSNP: rs866789949)	<i>gnomAD</i> : 0,0012% ALL 0,0027% NFE	-0,08	<b>KI. 3</b>

Zur besseren Übersicht sind die Patienten abwechseln in blau und grün eingefärbt. Weitere Details zur Einteilung der Varianten in eine der fünf Klassen anhand der ACMG-Kriterien sind im Anhang (S. II-V) beschrieben.

Zusammenfassend wurden bei den 14 eigens analysierten Patienten insgesamt 30 Varianten detektiert (s. Tabelle 22). Dabei handelte es sich bei 18 von ihnen von (wahrscheinlich) benigne Varianten, die nicht weiter berücksichtigt wurden. Ebenso fanden sich zwei Varianten in Genen unklarer Signifikanz. Bei neun Patienten wurden insgesamt zehn potentiell kausale Mutationen, d.h. Veränderungen der Klasse 3 - 5, gefunden: dabei wurden drei Varianten als Klasse 3, zwei Varianten als Klasse 4 sowie fünf als Klasse 5 eingestuft. Die Mutationen fanden sich dabei in neun verschiedenen Genen, wobei sieben *missense* Mutationen sowie drei *frame-shift* Mutationen identifiziert wurden. Eine Zusammenfassung dieser Ergebnisse ist in Abbildung 19 nachzulesen.



**Abbildung 19: Detektierte Varianten bei den 14 selbstständig analysierten Patienten**

Fünf der vierzehn untersuchten Patienten zeigten keine relevanten, potentiell-kausalen Genmutationen. Bei diesen ist die Genese ihrer Herzerkrankung entweder nicht genetisch oder aber durch eine Mutation in einem hier nicht untersuchten Gen verursacht. Bei diesen Patienten ist die genetische Analyse folglich nicht abschließend beendet und sollte, bei Verfügbarkeit weiterer Gene fortgeführt werden.

In den folgenden Abschnitten werden die detektierten Varianten einzeln vorgestellt.

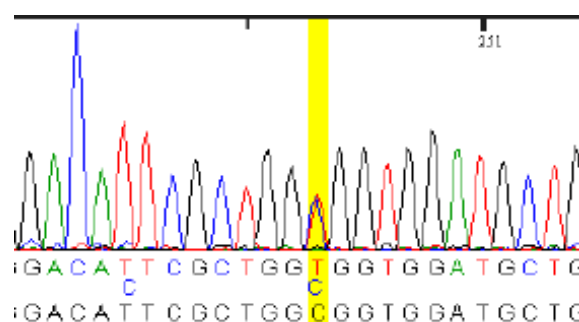


## Identifizierte Klasse 5 Varianten

### Beurteilung der Variante KCNJ2 (c.244C>T)

Die hier untersuchte Patientin überlebte im Jahr 2010 im Alter von 20 Jahren einen plötzlichen Herztod. Zuvor gab es keinerlei Hinweise für eine kardiale Erkrankung. Im Rahmen des anschließenden Krankenhausaufenthaltes zeigte sich eine deutliche Zunahme von VES unter der Katecholamin-Therapie, dennoch waren die Diagnosekriterien für eine CPVT nicht ausreichend erfüllt.

Die Probe der Patientin wies eine heterozygote, potenziell-kausale Genvariante (c.244C>T, NM\_000891.2) im Exon 2 des KCNJ2-Gens auf (s. Abb. 20). Diese führt zu einem Austausch von Arginin zu Tryptophan an Position 82 im Protein (p. (Arg82Trp)). Das Gen KCNJ2 kodiert für den einwärts gleichgerichtenden spannungsgesteuerten Kaliumkanal Kir2.1, der vor allem in Skelett- und Herzmuskelzellen exprimiert wird und in Letzteren vor allem wichtig für die Repolarisation der Myokardzellen nach jeder Kontraktion sowie für die Stabilisierung des Ruhemembranpotenzials ist. Die detektierte KCNJ2-Variante ist bei *HGMD*<sup>®</sup> als Variante bekannt und mit zwei Einträgen in *ClinVar*<sup>®</sup> als pathogen eingestuft. Darüber hinaus treten KCNJ2-Mutationen mit deutlich erhöhter Prävalenz gegenüber der Normalbevölkerung bei Personen mit Andersen-Tawil-Syndrom auf (46). Weitere Einschätzungen der Pathogenität der Mutation können in der obenstehenden Tabelle 23 nachgelesen werden. Insgesamt kann die detektierte Basensubstitution als Klasse 5 Variante („pathogen“) bezeichnet werden und ist mit der Klinik der Patientin gut vereinbar.



**Abbildung 20: missense-Mutation (C>T) im KCNJ2-Gen an der Position c.244**

Das Andersen-Tawil-Syndrom wurde erstmals 1971 von Ellen Andersen in ihrer Publikation *„Intermittent muscular weakness, extrasystoles, and multiple developmental anomalies“* beschrieben (47). In der aktuellen Literatur wird über eine Trias aus periodischer Paralysis, ventrikulärer Arrhythmie und verlängerten QT-Intervall berichtet, zusätzlich zu physischen Anomalien. Die Diagnose des

Andersen-Tawil-Syndroms wird in Kombination einer charakteristischen Klinik mit der Identifizierung einer KCNJ2-Mutation gestellt (48). Bei der untersuchten Patientin wurde bislang kein Verdacht des Andersen-Tawil-Syndroms geäußert und es finden sich in der Patientenakte keine Beschreibungen weiterer Charakteristika der Erkrankung, wie Entwicklungsanomalien. Dies sollte bei der Patientin zum nächst möglichem Zeitpunkt nachuntersucht werden, um der Patientin die bestmögliche Therapie gewährleisten zu können.

## Beurteilung der Variante MYH7 c.1633G>A

Bei dem heute 37-jährigen Patienten wurden mittels EKG ventrikuläre Extrasystolen mit mindestens drei Morphologien dokumentiert. Ebenso konnten symptomatische, nicht anhaltende VT unter Belastung festgestellt werden. Im Kardio-MRT erschienen die vier Herzkammern durchweg grenzwertig groß, wiesen jedoch alle eine normwertige Ejektionsfraktion auf. Im linken Ventrikel fand sich darüber hinaus jedoch eine auffällige Hypertrabekularisierung, ohne dass die Kriterien für eine linksventrikuläre Non-Compaction Kardiomyopathie erfüllt werden konnten.

Die Probe 12343-1 des Patienten zeigte eine heterozygote, Genmutation im MYH7-Gen (c.1633G>A), wie in Abb. 21 zu sehen ist. Durch Letztere kommt es an Position 545 (p.(Asp545Asn)) zu einem Austausch von Asparaginsäure zu Asparagin. Der physiochemische Unterschied zwischen den beiden Aminosäuren ist als gering einzustufen (*Grantham distance*: 23 [0-215]), jedoch ist Asparaginsäure hochgradig (bis hin zu zwölf Spezies) konserviert. Die Variante kommt in Vergleichspopulationen selten vor, genauer gesagt mit einer MAF von 0,00081%. Der Aminosäureaustausch verursacht nach Angaben der HGMD® eine *Non-Compaction Cardiomyopathie* (46). Ebenso war die Variante bei ClinVar® gelistet, als *likely pathogenic* für einen kardiovaskulären Phänotyp und als *uncertain significance* für HCM.

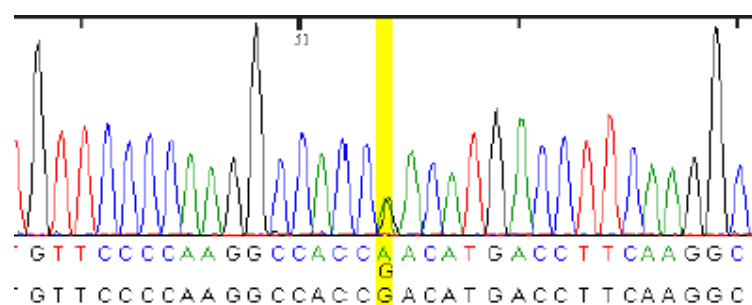


Abbildung 21: missense-Mutation (G>A) im MYH7-Gen an Position c.1633

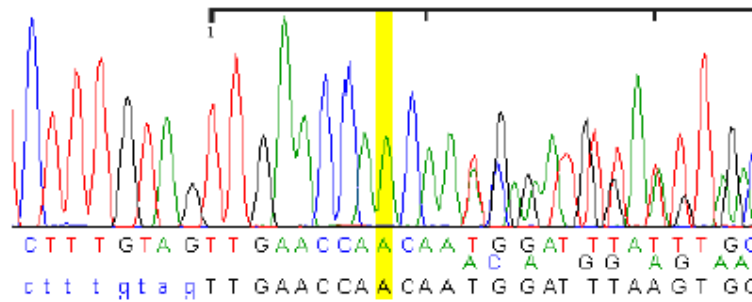
Das MYH7 codiert für die schwere  $\beta$ -Kette des kardialen Myosins und ist somit essentiell für den Aufbau und die Kontraktion von Muskelfasern, vor allem in den Ventrikeln sowie in Typ-I-Muskelfasern der Skelettmuskulatur. Veränderungen der Gensequenz des MYH7-Gens beeinflussen die Kontraktionsgeschwindigkeit des Herzmuskels, so sind Mutationen des Gens assoziiert mit der HCM, der DCM und einer Form von Muskeldystrophie (49). Die Aminosäuresubstitution erfolgt in einem funktionell wichtigen Abschnitt des Proteins und zwar dem Myosin-Kopf, der sogenannten Motordomäne, welche essentiell für die Herzmuskelkontraktion ist.

Das klinische Erscheinungsbild des Patienten ist gut mit der detektierten Genmutation zu vereinbaren. Aufgrund der in Tabelle 23 aufgelisteten sowie der oben genannten Einschätzungen wurde die detektierte Variante gemäß der ACMG-Klassifizierung als Klasse 5 Variante („pathogen“) eingestuft.

### **Beurteilung der Variante TTN c.47884\_47887dup**

Bei der heute 43-jährigen Patientin wurde echokardiographisch eine stark verminderte Pumpfunktion des linken, leicht dilatierten Ventrikels bei einer Ejektionsfraktion von 25% festgestellt. Eine KHK sowie strukturelle Veränderungen konnten ausgeschlossen werden. Elektrokardiographisch wurden bei der Patientin Breitkomplex-Salven sowie polymorphe VES mit zwei Morphologien dokumentiert. Die VES Last betrug ca. 28% aller Herzaktionen. Es erfolgte schließlich eine Versorgung mit einem externen tragbaren Defibrillator (LifeVest®). Zudem wies die Patientin eine positive Familienanamnese bezüglich des plötzlichen Herztodes auf.

Die Genanalyse zeigte eine *frame-shift* Mutation durch Basenduplikation im Exon 257 des Titin-Gens auf, was zu einer Verschiebung auf Proteinebene führte (p.(Met15963Asnfs\*8). Der Mutationsnachweis mittels Sanger-Sequenzierung ist in Abbildung 22 dargestellt. Ein pathogener Effekt der hier detektierten heterozygoten c.47884\_47887 Duplikation, welche bisher noch nicht in der Literatur beschrieben ist, ist sehr wahrscheinlich, da aufgrund des *frame-shift* die Translation frühzeitig terminiert, was zu einer Degradation der RNA (*nonsense mediated decay*) oder zumindest zu einem veränderten Aufbau des Proteins führt (49).



**Abbildung 22: *frame-shift* Mutation durch Duplikation von ACAA im TTN-Gen an Position c.47884\_47887**

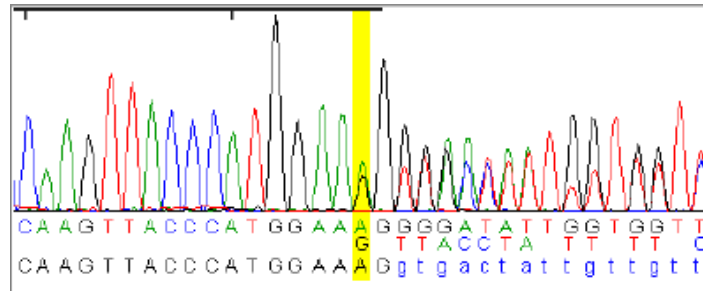
Humanes Titin besteht aus ca. 34.350 Aminosäuren und stellt somit das Größte aller derzeit bekannten menschlichen Proteine dar (7). Titin ist Bestandteil der Sarkomere, i.e. den funktionellen Einheiten eines Muskels, und sorgt unter anderem durch seine Elastizität für die Stabilität der für die Kontraktion wichtigen Proteine, wie Aktin oder Myosin (49). TTN-Mutationen sind mit einer Vielzahl von Erkrankungen assoziiert, so wie einer Reihe von Muskeldystrophien. Darüber hinaus stellt Titin eines der Hauptgene der DCM dar (49). Die hier detektierte *frame-shift* Mutation führt zu einem Stopp-Codon acht Positionen nach der Aminosäure Methionin, welche die 15 963. Aminosäure der insgesamt 34 350 Aminosäuren des Titins darstellt (49). Die Translation endet bei weniger als der Hälfte des ursprünglichen Proteins und führt sehr wahrscheinlich zu funktionellen Ausfällen desselben.

Somit handelt es sich um eine Nullvariante im Titin-Gen, in welchem ein Funktionsverlust ein bekannter Pathomechanismus ist (50). Folglich liegt ein *pathogenic very strong*-Kriterium nach ACMG vor, die detektierte Variante ist daher als Klasse 5 Variante („pathogen“) einzustufen. Auch passt die Klinik der Patientin gut zu der detektierten Genmutation.

### **Beurteilung der Variante TTN c.2075del**

Die damals 72-jährige Patientin überlebte im November 2011 einen plötzlichen Herztod bei Kammerflimmern und zeigte zudem eine dilatative Kardiomyopathie mit mittelgradig reduzierter LVEF (45%) sowie apikal betonte Hypertrabekularisierung. Bereits zuvor hatte die Patientin immer wieder Präsynkopen erlitten und Palpationen verspürt. Ebenso bestand eine positive Familienanamnese für Arrhythmien und den SCD.

Die dazugehörige Probe 1616-1 wies einen *frame-shift* im Titin-Gen auf, bedingt durch eine Deletion von zwei Nukleotiden, wodurch es zu einer vorzeitigen Bildung eines Stopp-Codons elf Tripletts später kommt (p.Lys692ArgfsTer11). Die *frame-shift* Mutation ist in Abb. 23 dargestellt.



**Abbildung 23: frame-shift-Mutation durch Deletion der Base A im TTN-Gen an Position c.2075**

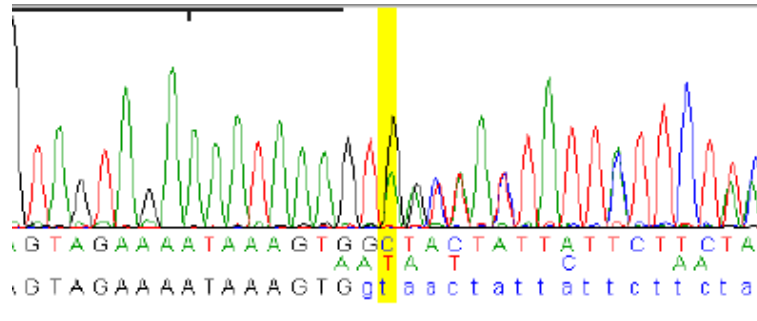
Das Gesamtprotein ist somit signifikant verkürzt, insbesondere da die Rasterschubmutation bereits im Exon 13 vorliegt. Das gesamte TTN-Gen besteht aus 365 Exonen, sodass ein vorzeitiger Abbruch im Exon 13 eine signifikante Verkürzung des Proteins bedeutet und eine regelrechte Funktionalität des Proteins äußerst fragwürdig ist.

Zusammenfassend handelt es sich um eine Nullvariante im Titin-Gen, in welchem ein Funktionsverlust ein bekannter Pathomechanismus ist (50). Somit ist das *very strong pathogenic* – Kriterium nach ACMG erfüllt, sodass die Variante als Klasse 5 Mutation einzustufen ist. Insgesamt ist die detektierte Genmutation sehr gut mit der vorliegenden Kardiomyopathie zu vereinbaren.

### **Beurteilung der Variante DSG2 c.828\_828+2del**

Bei dem hier untersuchten 26-jährigen Patienten bestand eine ausgeprägte rechtsventrikuläre Dilatation mit einer hochgradig eingeschränkten Ejektionsfraktion von 17% sowie eine Trikuspidalklappen-Insuffizienz II°. Darüber hinaus bestanden ventrikuläre Extrasystolen sowie ein inkompletter Rechtsschenkelblock. Während im MRT typische ARVC/D-Veränderungen beschrieben wurden, konnte durch eine Biopsie trotz Nachweis einer lipomatösen Infiltration keine sichere Diagnosestellung einer ARVC/D erfolgen.

Die DNA Probe des Patienten zeigte eine heterozygote Veränderung im DSG2-Gen (c.828+2del, p.Glu278Lysfs\*11) und zwar eine Deletion von drei Nukleotiden, die an der letzten Position des Exons beginnt und auch die ersten beiden Basen des nachfolgenden Introns betrifft. Auf mRNA Ebene liegt damit eine 1-Basenpaar-Deletion vor und zudem ist die angrenzende *Splice Site* betroffen. Der genaue Effekt dieser Mutation auf Proteinebene ist nicht vorhersagbar. Der Mutationsnachweis mittels Sanger-Sequenzierung ist in Abbildung 24 dargestellt.



**Abbildung 24: frame-shift Mutation im DSG2-Gen durch Deletion von GGC an Position c.828+2**

Das Desmoglein2-Gen (DSG2; Chr. 18q12; 1.118 Aminosäuren) kodiert ein interzelluläres, desmosomales Adhäsionsprotein und verursacht eine Hauptform der arrhythmogenen, rechtsventrikulären Kardiomyopathie (ARVC-10) (51). Darüber hinaus kommt die Veränderung in einem großen Kontrollkollektiv (>5.000 Personen; *ExomeVariantServer*) nicht vor. Somit sind für die Variante zwei *pathogenic moderate*-Kriterien nach ACMG erfüllt. Da es sich hierbei um eine Nullvariante in einem Gen, in welchem ein Funktionsverlust ein bekannter Pathomechanismus ist, handelt, ist zusätzlich das *very strong pathogenic*-Kriterium nach ACMG erfüllt. In vitro Expressionsdaten hinsichtlich der funktionellen Auswirkung der Genmutation sind nicht bekannt. Eine Kausalität der Mutation mit der Erkrankung ist insgesamt dennoch wahrscheinlich, weil die Mutation aufgrund ihrer Lage innerhalb des Proteins biochemisch relevant ist und in einer hoch-konservierten Domäne liegt. Verschiedene Pathogenitätsprogramme (*MaxEnt*, *NNSPLICE*, *SSF*), welche in silico die Auswirkungen auf die nächst liegende *splicesite* bewerten, haben einen Ausfall der benachbarten *splicesite* errechnet und legen somit einen biochemischen (und damit pathogenen) Effekt nahe.

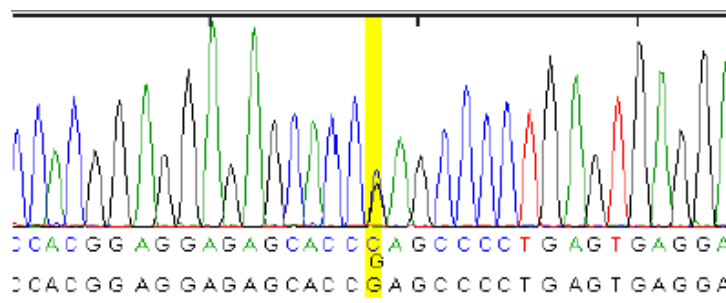
Zusammenfassend wurde die Variante als Klasse 5 Variante klassifiziert. Bezüglich der Krankheitskausalität ist die detektierte DSG2-Variante sehr gut mit dem Krankheitsbild des Patienten vereinbar und als sehr wahrscheinlich kausal anzusehen.

## Identifizierte Klasse 4 Varianten

### Beurteilung der Variante SCN5A c.5350G>C

Die heute 28-jährige Patientin litt seit 2010 an rezidivierenden Synkopen in emotionalen sowie körperlichen Stresssituationen sowie polymorphen ventrikulären Extrasystolen in Belastungssituationen. Es erfolgte eine ICD-Implantation, welcher seitdem mehrfach Schocks bei Extrasystolie getriggerten Kammerflimmern abgegeben hatte. Ebenso wurden zahlreiche nicht-anhaltende ventrikuläre Tachykardien detektiert. Zudem bestand eine deutlich positive Familienanamnese für den plötzlichen Herztod.

Die dazugehörige Probe 12083-1 zeigte eine heterozygote Variante im SCN5A-Gen (NM\_198056.2, c.5350G>C), welche als Ursache der Erkrankung angesehen werden kann. Der Nachweis der *Missense* Mutation ist in Abbildung 25 dargestellt. Durch den Austausch der Guanin- zu einer Cytosin-Base im Exon 28 kodiert das Basentriplett für Glutamin statt für Glutaminsäure an Position 1784 (p.(Glu1784Gln)). Letztere ist an dieser Position hoch konserviert (bis hin zu neun Spezies), wenn auch der physiochemische Unterschied zwischen bei beiden Aminosäuren gering ist (*Grantham distance* von 29 [0 – 215]). Das SCN5A Gen kodiert für einen Proteinbaustein eines spannungsgesteuerten Natriumkanals, durch welchen positiv geladene Natrium-Ionen in die Zelle strömen können. Der kardiale Natriumkanal SCN5A spielt eine Schlüsselrolle zu Beginn eines kardialen Aktionspotentials. Mutationen des SCN5A Gens können das LQT Typ 3 Syndrom verursachen sowie das Brugada Syndrom 1. Ebenso wurden sie bereits im Zusammenhang mit dem plötzlichen Kindstod beschrieben (49).



**Abbildung 25: missense-Mutation (G>C) im SCN5A-Gen an Position c.5350**

Die identifizierte Basensubstitution ist in der *HGMD*<sup>®</sup> unbekannt, allerdings ist an dieser Position der Austausch des Guanins zu Cytosin, welcher die Substitution von Glutamat zu Lysin bedingt, unter anderem als wahrscheinlich kausal für ein LQT-3-Syndrom beschrieben. Zudem erfolgt der Austausch

in einer hoch konservierten Domäne des Proteins mit zahlreichen, negativ geladenen Aminosäuren (52). Da auch Glutamin (hier detektierte Aminosäuresubstitution) wie Lysin neutral geladen ist, wird es durch den Austausch vermutlich zu denselben strukturellen Einschränkungen kommen wie in der Publikation beschrieben. Aufgrund der Konservierung der ausgetauschten Aminosäure, der Lokalisation der Veränderung in einem funktionell wichtigen Bereich sowie der unbekanntes Allelfrequenz kann die Genvariante durchaus kausal für die Symptomatik der Patientin sein. Insgesamt ist die Genvariante als Klasse 4 Variante zu klassifizieren.

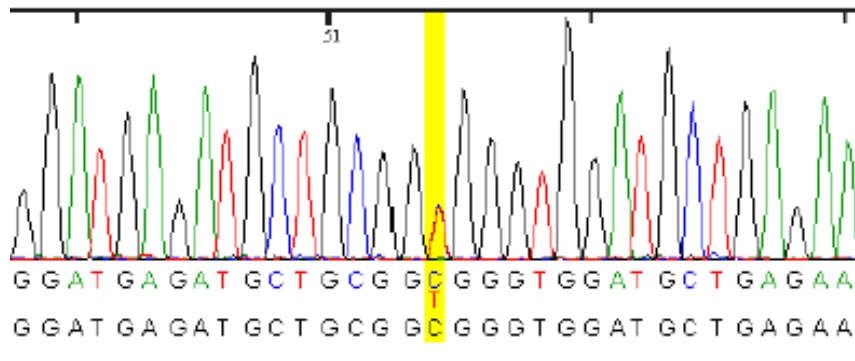
### **Beurteilung der Variante LMNA c.568C>T**

Die heute 40-jährige Patientin berichtete seit 2016 bestehende Palpationen, eine einmalige Präsynkope sowie verminderte körperliche Belastbarkeit. Elektrokardiographisch fielen vereinzelt monomorphe VES auf, welche sowohl in Ruhe als auch unter Belastung auftraten. Zudem stellte sich der linke Ventrikel in der Echokardiographie etwas vergrößert bei normwertiger LVEF dar. Bei einer nachfolgenden Katheteruntersuchung konnte eine KHK sowie ein Shunt-Vitium ausgeschlossen werden. Darüber hinaus zeigte die Patientin eine hochpositive Familienanamnese für die dilatative Kardiomyopathie und den SCD (u.a. Mutter, Großonkel und Großmutter mütterlicherseits, Cousins, Tante und Onkel mütterlicherseits).

Die Probe 12314-1 zeigte eine heterozygote Mutation im LMNA-Gen, welche als kausal für DCM beschrieben wird. Der Mutationsnachweis mittels Sanger-Sequenzierung ist in Abbildung 26 dargestellt. Durch den Austausch einer Cytosin-Base zu Thymin im Exon 3 des LMNA Gens wird an Position 190 (p.(Arg190Trp)) des Proteins statt Arginin die Aminosäure Tryptophan eingebaut. Dieser Austausch wird bei *dsSNP*<sup>®</sup>, *Uniprot*<sup>®</sup> als auch bei drei Veröffentlichungen in *ClinVar*<sup>®</sup> als pathogen eingestuft. Die Variante ist in entsprechenden Kontrollpopulationen sehr selten. In einer der publizierten Veröffentlichungen bezüglich der LMNA-Variante wurden die funktionellen *in vitro* und *in vivo* Auswirkungen untersucht, wobei die Kausalität der LMNA-Variante für eine DCM nicht eindeutig nachgewiesen werden konnte (53). Daher und aufgrund der in Tabelle 23 angegebenen Merkmale der Variante lässt sich diese Basensubstitution als Klasse 4 Variante („möglicherweise pathogen“) einordnen.

Insgesamt kann die Erkrankung der Patientin als AUCM mit dilatativen Verlauf beschrieben werden und ist konform mit der hier detektierten Variante im LMNA-Gen.





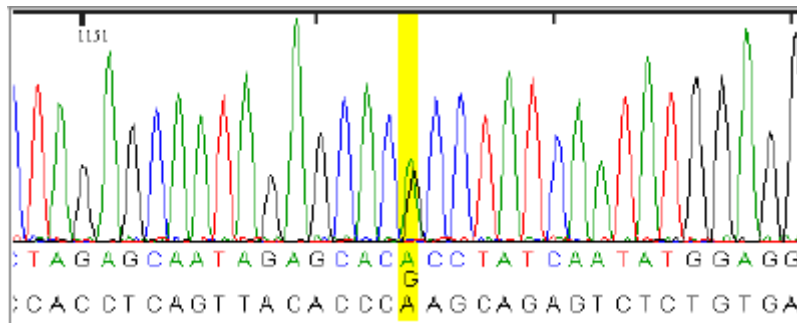
**Abbildung 26: missense Mutation (C>T) im LMNA-Gen an Position c.568**

Das LMNA (Lamin A/C) Gen kodiert hauptsächlich für die Strukturproteine Lamin A und Lamin C, bei welchen es sich um Intermediärfilamente handelt, die unter anderem zusammen mit weiteren Proteinen die Zellkernhülle (auch: nukleäre Lamina) bilden (49). Veränderungen im LMNA-Gen werden beispielsweise mit dem Hutchinson-Gilford-Syndrom, diversen Muskeldystrophien und der dilatativen Kardiomyopathie assoziiert.

## Identifizierte Klasse 3 Varianten

### Beurteilung der Variante LAMA4 c.4405G>A

Bei der hier untersuchten 37-jährigen Patientin wurden ein leicht dilatierter linker Ventrikel sowie ein maligner Mitralklappenprolaps, welcher sekundär im Rahmen einer dilatativen Kardiomyopathie auftreten kann, festgestellt. Zudem wurden monomorphe ventrikuläre Extrasystolen in Ruhe sowie pleomorphe Couplets ventrikulärer Extrasystolen unter Belastung dokumentiert, ebenso weist die Patientin eine positive Familienanamnese für den SCD auf und wurde prophylaktisch mit einem ICD versorgt. Die zugehörige Probe 12260-1 wies eine heterozygote, potentiell-kausale Mutation im LAMA4-Gen auf, genauer gesagt eine *Missense* Mutation an Position c.4405, welche zu einem Austausch der Aminosäure Alanin zu Threonin an Position 1469 (p.(Ala1469Thr)) führt. Der Mutationsnachweis mittels Sanger-Sequenzierung ist in Abbildung 27 dargestellt.

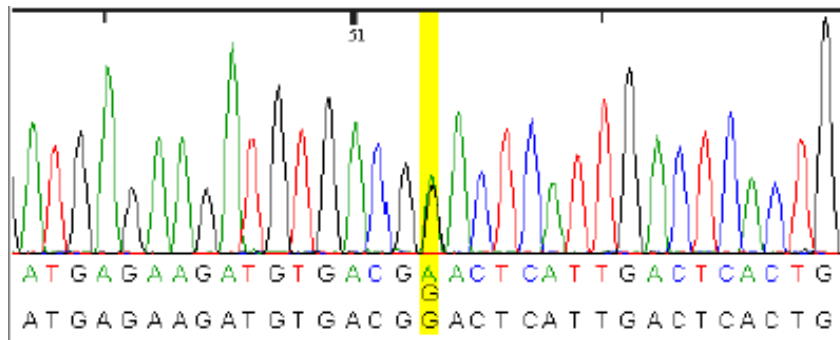


**Abbildung 27: Heterozygote missense-Mutation (G>A) im LAMA4-Gen an Position c.4405**

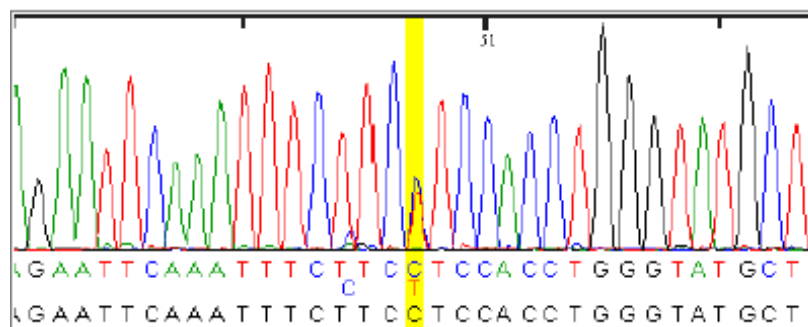
LAMA4 steht für Laminin Untereinheit Alpha 4. Das Gen codiert für eine der drei Ketten der Laminin-Glykoproteine, welche neben den Kollagenen den Hauptbestandteil von Basalmembranen ausmachen. Dadurch sind die Laminine in eine Vielzahl von biologischen Prozessen involviert, wie beispielsweise der Zelladhäsion, der Differenzierung und der Zellmigration. Funktionell relevante Mutationen im LAMA4 Gen führen unter anderem zu zwei verschiedenen Formen der DCM (49). Die hier detektierte Variante ist bei *ClinVar*<sup>®</sup> und *dbSNP*<sup>®</sup> gelistet, jedoch als *uncertain significance* klassifiziert. Die Allelfrequenz der Genvariation liegt bei Europäer bei 0,017% und ist damit im Vergleich zur Prävalenz der DCM (0,0001%) deutlich höher. Die Sequenzvariation entspricht insgesamt weder den Anforderungen für eine Klassifizierung als benigne (Kl. 1 oder 2) noch denen für pathogene Varianten (Kl. 4 oder 5). Aufgrund der nicht ausreichenden Literatur bezüglich der Genvariante sowie der deutlich höheren Allelfrequenz im Vergleich zur Inzidenz, ist diese Variante als Klasse 3 Variante (*variant of uncertain significance, VUS*) eingestuft worden. Das Krankheitsbild der hier untersuchten Patientin ist (unter Vorbehalt) mit der vorliegenden Genvariante zu vereinbaren.

### **Beurteilung der Varianten RYR2 c.2444C>T und PKP2 c.1742G>A**

Bei dem hier untersuchten, damals 52-jährigen Patienten bestanden polymorphe ventrikuläre Extrasystolen in Ruhe und Belastung. Ein Kardio-MRT war nicht beweisend für eine ARVC/D, jedoch fanden sich dabei fokale KM-Anreicherungen sowie eine Hypertrophie des Ventrikelseptums. Die zugehörige Probe 12421-1 wies eine heterozygote PKP2-Mutation auf sowie darüber hinaus eine heterozygote, potentiell-kausale RYR2-Mutation. In Abbildung 28 und 29 ist der Nachweis beider *missense* Varianten mittels Sanger Sequenzierung dargestellt.



**Abbildung 28: missense Variante (G>A) im PKP2-Gen an Position c.1742**



**Abbildung 29: missense Variante (C>T) im RYR2-Gen an Position c.2444**

Die detektierte PKP2 Variante sorgt für einen Austausch von Glycin zu Glutaminsäure an Position 581 (p.(Gly581Glu)). Mit Glycin an dieser Position handelt es sich um eine hochkonservierte Aminosäure, welche bis hin zu acht Spezies konserviert ist. Der physiochemische Unterschied zwischen den beiden Aminosäuren ist allerdings als gering einzustufen mit einer *Grantham distance* von 98 [0-215]. Die PKP2 Variante ist zweimal bei *ClinVar*<sup>®</sup> bekannt und dort als *variant of uncertain significance* eingestuft. Die Allelfrequenz ist mit 0,0027% bei nicht-finnischen Europäern angegeben. Insgesamt sind lediglich ein *pathogenic supporting* Kriterium sowie ein *moderate* Kriterium nach ACMG erfüllt, womit die Variante, wie auch bei den *ClinVar*<sup>®</sup> Berichten, als VUS (Klasse 3) eingeordnet werden muss.

Das PKP2 Gen kodiert für Plakophilin-2, ein Protein, was sich vor allem in den Zellen des Myokards findet und dort am Aufbau der Desmosomen beteiligt ist. Somit ist Plakophilin-2 an der Zellstabilität wie auch an der Signalweiterleitung zwischen Kardiomyozyten beteiligt. PKP2 ist eines der Hauptgene, in welchen Mutationen, die zu der ARVC/D führen, zu finden sind. Durch Mutationen im PKP-2 Gen können abnorme Desmosomen entstehen, wodurch die Zellen des Myokards nicht mehr ausreichend miteinander verbunden sind und Apoptose begehen, vor allem unter Zellstress-Situationen. Die zerstörten Strukturen werden durch Fett- und Bindegewebe ersetzt, wodurch langfristig die Wand des

rechten Ventrikels dilatiert und es aufgrund der gestörten Signalweiterleitung zwischen den Kardiomyozyten zu Arrhythmien kommen kann (49).

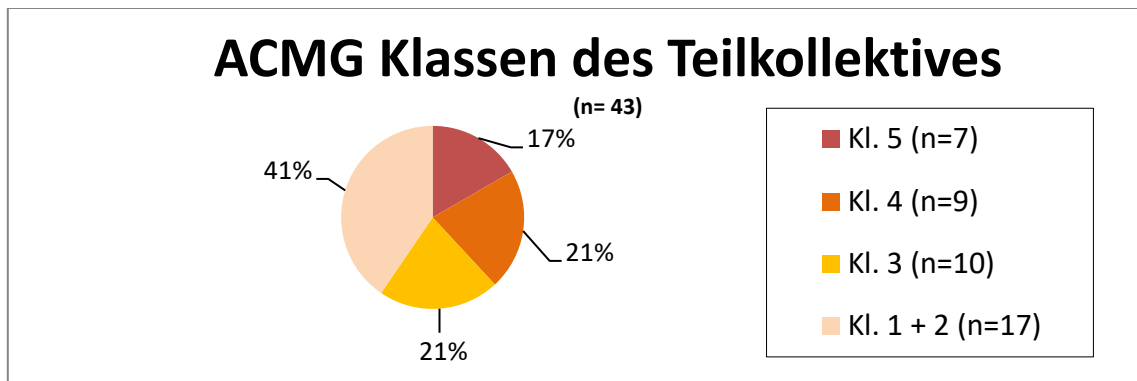
Darüber hinaus wurde zusätzlich eine RYR2 Variante detektiert, durch welche es an Position 815 zu einem Austausch der hochkonservierten Aminosäure Prolin zu Leucin (p.(Pro815Leu)) kommt. Auch diese Variante ist bei *ClinVar*<sup>®</sup> bekannt und ebenfalls als VUS beschrieben. Die Allelfrequenz ist bei *gnomAD*<sup>®</sup> mit 0,0067% bei nicht-finnischen Europäern angegeben.

Das Gen RYR2 kodiert für den Ryanodin Rezeptor 2 und gehört zu der Familie der Ryanodin-Rezeptoren, welche in den sarkoplasmatischen Retikula der Kardiomyozyten Kanäle für positiv geladene Kalzium-Ionen bildet. Durch die Freisetzung von Ca<sup>2+</sup>-Ionen aus dem sarkoplasmatischen Retikulum in das Cytoplasma kommt es zur Kontraktion der Herzmuskelzellen (49). Da bei dieser Variante lediglich zwei *pathogenic supporting*-Kriterien sowie ein *moderate*-Kriterium nach ACMG erfüllt sind, ist diese wie auch die oben beschriebene PKP2 Variante als VUS (Klasse 3) einzuordnen.

Der uneindeutig arrhythmische Phänotyp des Patienten ist unter Vorbehalt mit den detektierten Genvarianten zu vereinbaren. Zusätzlich wurden beide Kinder des Patienten genotypisch auf die zwei detektierten Genvarianten getestet. Dabei wurde bei Beiden die PKP2 Variante nachgewiesen, die RYR2 Variante jedoch nur bei dem Sohn (Jahrgang 2002). Bei der Tochter des Patienten (Jahrgang 2004) lagen beide Allele des RYR2 Gens als Wildtyp vor. Beide Kinder sind derzeit kardial asymptomatisch, jedoch sollte bedacht werden, dass eine altersabhängige Krankheitsmanifestation vorliegen könnte, weshalb insbesondere bei dem Sohn regelmäßige Kontrollen zu empfehlen sind.

### **3.1.3 Retrospektive Auswertung der identifizierten Genvarianten in einem Patientenkollektives von 43 AUCM Patienten**

Um eine bessere statistische Auswertung bezüglich kausaler Gene der AUCM zu erhalten, wurden zusätzlich zu den 14 eigenständig analysierten Patienten bei weiteren 43 AUCM Patienten, bei welchen bereits in der Vergangenheit ein *next-generation sequencing* erfolgt war, die detektierten Genvarianten näher analysiert. Dabei konnte bei 16 weiteren Patienten mindestens eine potentiell kausale Genmutation (Kl. 4 o. 5) detektiert werden, wohingegen bei 17 AUCM-Patienten keine pathogene Variante identifiziert wurde. Bei zehn Patienten fand sich keine wahrscheinlich kausale Variante, aber mindestens eine VUS (Kl. 3). Eine graphische Darstellung der ACMG Klassen dieses Teilkollektives aus 43 Patienten ist in Abbildung 30 zu sehen. Nähere Details zu der Klassifizierung des Teilkollektives mittels der ACMG Kriterien sind im Anhang (Tabelle 33) nachzulesen.



**Abbildung 30: Aufteilung der Patienten anhand der bei ihnen detektierten Varianten**

Manche Patienten wiesen dabei mehrere Sequenzvarianten auf, so gab es bei 43 Patienten insgesamt 56 detektierte Varianten. Davon waren 23 Varianten den Klassen 1 und 2 zuzuordnen. Die Tabelle 24 führt sieben Varianten der Klasse 5 und elf detektierte Varianten der Klasse 4 des Teilkollektives von 43 Patienten auf. In Tabelle 25 sind 15 Varianten der Klasse 3 aufgeführt.

**Tabelle 24: Potenziell kausale Genvarianten (Kl. 4 und 5) bei 43 AUCM Patienten**

Patienten-ID der Probe	Gen	ACMG-Klasse	Basenaustausch (c. ...)	Aminosäurenaustausch (p. ...)
12590-1	PKP2	5	1664del	Phe555Ser fs*8
11122-3	DSP	5	2616dup	Gln873Thrfs*5
12026-1	MYBPC3	5	3791G>T	Cys1264Phe
12100-1	DSC2	5	510C>G	Tyr170*
12144-1	KCNH2	5	3400C>T	Arg1134*
12507-1	ABCC9	5	3475del	Asp1159Thr fs*43
12144-1	DSG2	5	852_855delTCAA	Val286Alafs*2
11979-1	DES	4	1205T>C	Ile402Thr
11441-1	DSG2	4	1003A>G	Thr335Ala
12181-1	RBM20	4	3584 C>A	Ser1195Tyr
12003-3	DTNA	4	2195 T>C	Leu732Pro
11014-3	DSP	4	293 G>C	Gly98Ala
12158-1	ACTN2	4	1657-2del	Leu554Aspfs*5
12576-1	DES	4	407T>C	Leu136Pro
12100-1	SCN5A	4	193C>T	Pro65Ser
12438-1	CACNA1C	4	2399A>C	Lys800Thr
11420-1	RYR2	4	4069G>C	Asp1357His
12657-1	LMNA	4	1232dup	Gly412Trpfs*14

**Tabelle 25: Detektierte *variants of uncertain significance* (Kl. 3) bei AUCM Patienten**

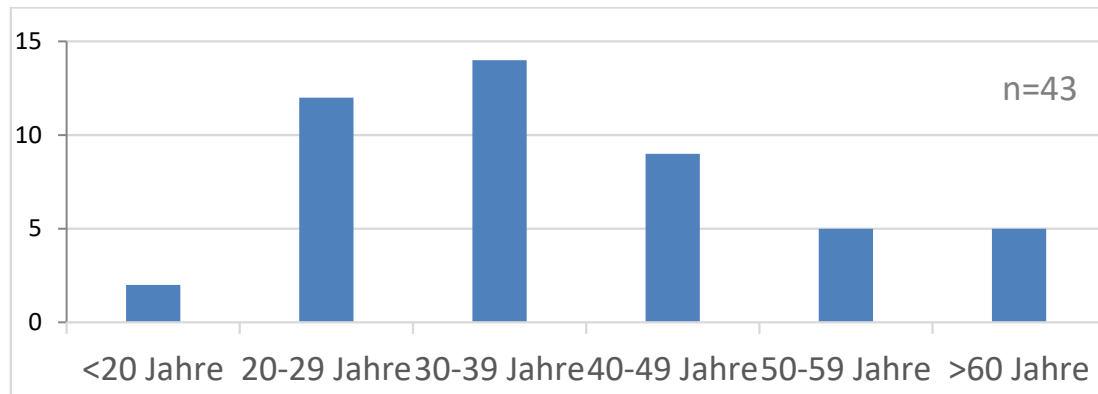
Patienten-ID der Probe	Genvariante	Basenaustausch (c. ...)	Aminosäurenaustausch (p. ...)
12026-1	DSP	4109T>A	Ile1370Asn
12026-1	DSC2	1750A>G	Ile584Val
622-1	CALR3	356A>G	Gln119Arg
12294-1	TGFβ2	161dup	Glu55Argfs*5
12126-1	ANK2	10831G>A	Asp3611Asn
1040-1	SGCD	731C>T	Pro244Leu
12489-1	MURC	c.1091C>T	Ser364Leu
12047-1	DSP	7994C>T	Thr2665Met
12583-1	DSG2	2405A>G	Glu802Gly
12100-1	RBM20	686A>G	Tyr229Cys
12135-1	CACNB2	265G>A	Glu89Lys
12507-1	TRDN	691A>G	Lys231Glu
11420-1	DES	1040G>A	Arg347Lys
12144-1	AKAP9	2836 G>C	Glu946Gln
12432-1	TGB3	806A>G	Asn306Asp

### 3.1.4 Die AUCM ist eine heterogene Erkrankung

Ein Ziel dieser Arbeit war die Identifizierung von Genen, welche kausal für die Entstehung der arrhythmogenen unklassifizierten Kardiomyopathie verantwortlich sind. Dazu wurden Blutproben von Patienten des IfGH durch *next-generation sequencing* untersucht und die detektierten Genvarianten ausgewertet.

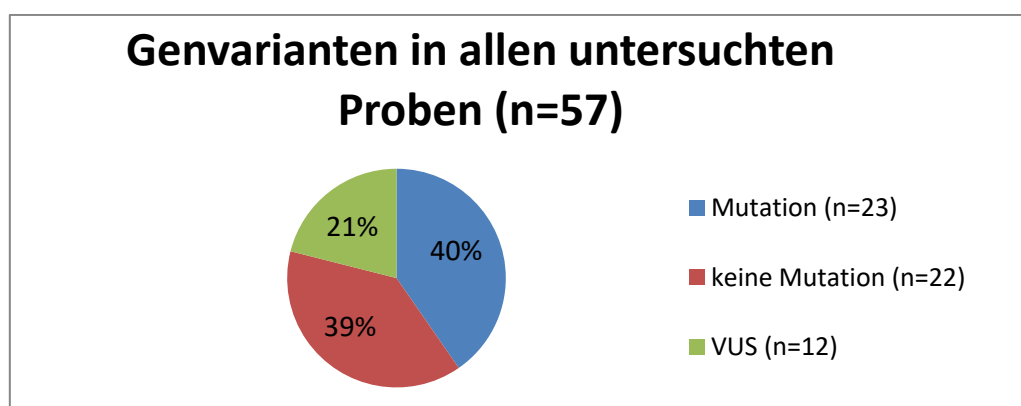
Zur Auswertung lagen insgesamt 57 AUCM Patienten vor, welche zum Teil bereits sequenziert worden waren. 14 Patienten wurden eigenständig mit einem *MiSeq*<sup>®</sup> *Run* analysiert und die detektierten Genvarianten zusätzlich mit der Sanger-Sequenzierung verifiziert. Der Genotyp der anderen 43 Patienten war im Vorfeld dieser Arbeit analysiert worden. Das gesamte AUCM-Patientenkollektiv umfasste Proben von 42 Frauen und 15 Männer, was einem Verhältnis von 2,8:1 entspricht. Das mittlere Alter aller in die Analysen eingeschlossenen Patienten betrug 38,51 Jahre bei Diagnosestellung. Die Altersspanne bei Diagnosestellung reichte dabei von 17 bis 73 Jahren.

In Abbildung 31 ist die Altersverteilung der Patienten graphisch dargestellt. Bei allen Patienten bestand eine kardiale Symptomatik mit teils arrhythmischem, teils kardiomyopathischem Schwerpunkt. Die Diagnose der arrhythmogenen unklassifizierten Kardiomyopathie wurde überwiegend von Kardiologen des Universitätsklinikums Münster gestellt.



**Abbildung 31: Altersverteilung der in die Untersuchung eingeschlossenen Patienten**

Von den insgesamt 57 Patienten fand sich bei 23 Patienten mindestens eine eindeutig-kausale Mutation, bei 12 Patienten (mindestens) eine Variante unklarer Signifikanz (VUS) sowie bei 22 Patienten keine kausale Mutation. Die Sensitivität der Panel-basierten Sequenzanalyse lag in Bezug auf das gesamte AUCM Patientenkollektiv demnach bei 61,4 %, was als Hinweis dafür gesehen werden kann, dass diese Erkrankung zum großen Teil genetisch bedingt ist. Die Ergebnisse sind in Abbildung 32 graphisch dargestellt.

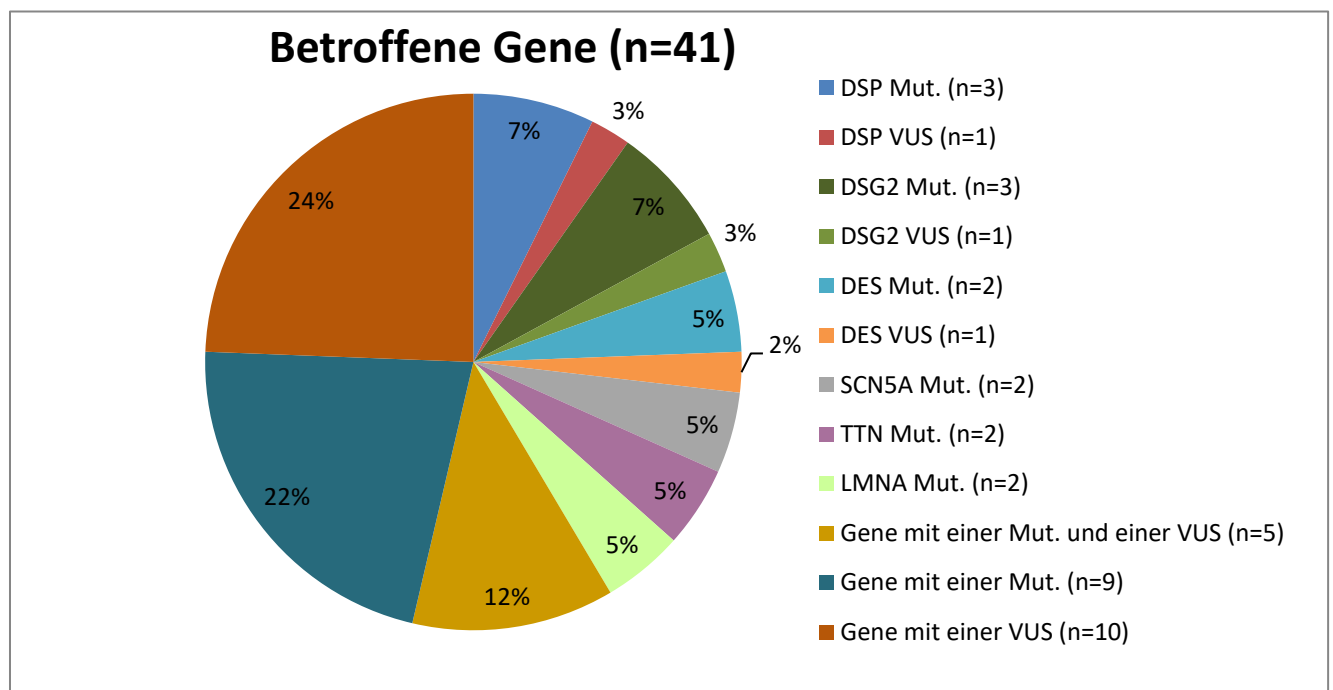


**Abbildung 32: Anteil der untersuchten Proben mit positivem Genbefund (Mutation oder VUS) bzw. ohne kausale Genmutation**

In Bezug auf den Mutationstyp wurden in der Gruppe der als Mutation oder VUS eingestuft Varianten 33 Punktmutationen, darunter 31 *missense* Mutationen und zwei *nonsense* Mutationen, sowie zehn *frame-shift* Mutationen identifiziert.

Insgesamt scheint die AUCM eine variable Penetranz, insbesondere in Bezug auf die altersabhängige Penetranz, zu haben und diversen Umweltfaktoren zu unterliegen. Dies zeigt sich insbesondere in der breiten Varianz des Alters bei Erstdiagnose der AUCM (17-73 Jahre).

Durch die Analysen konnte zudem festgestellt werden, dass die genetische Komponente der AUCM sehr heterogen ist und verschiedene Gruppen von kardialen Krankheitsgenen für die Erkrankung verantwortlich sind. Das heißt, es gibt nicht *ein* bestimmtes AUCM-verursachendes Gen bzw. *eine* bestimmte kausale Mutation, sondern vielmehr eine ganze Bandbreite von Genen, in denen Mutationen zu der Erkrankung führen. Die Verteilung der detektierten Varianten ist in Abbildung 33 dargestellt.



**Abbildung 33: Verhältnis der Gene mit detektierten Varianten zueinander**  
(Mut. = Mutationen)

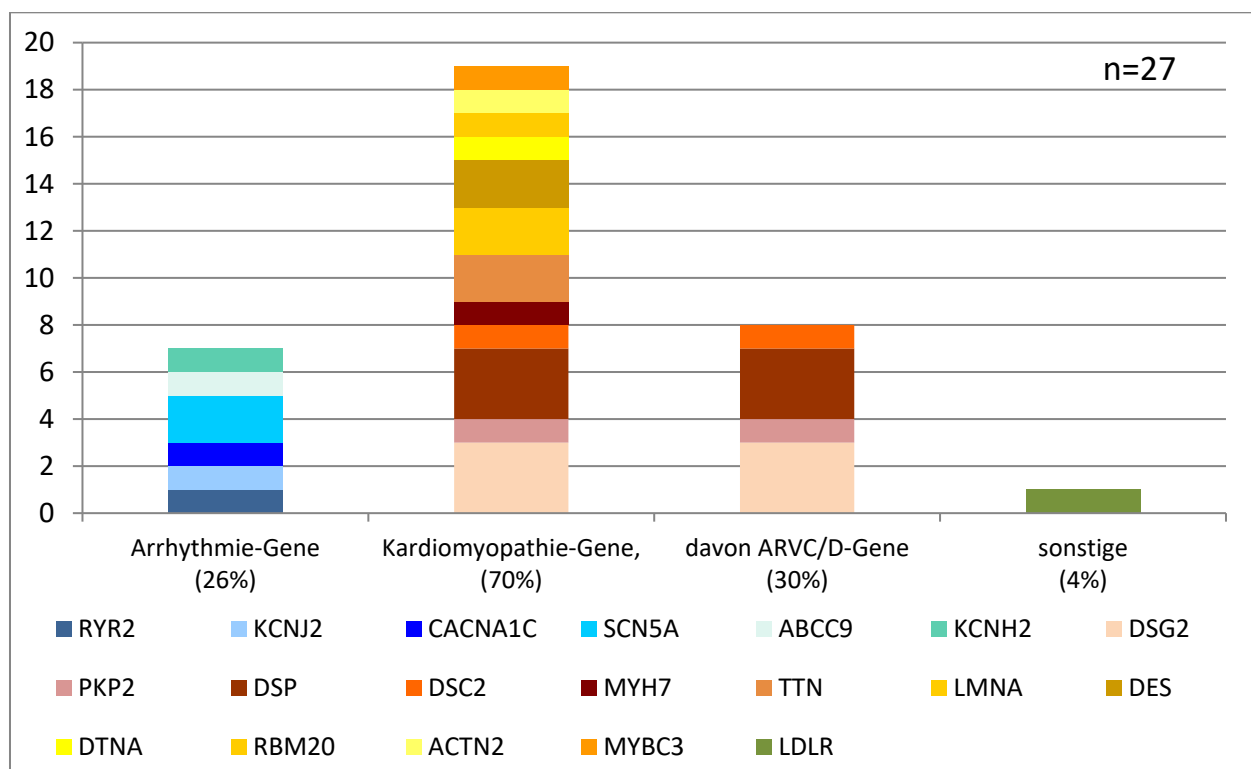
Insgesamt wurden im Rahmen dieser Arbeit 27 potentiell-pathogene Varianten der Klasse 4 und 5 in 19 verschiedenen Genen detektiert. Am häufigsten fanden sich dabei Genmutationen in Strukturgenen, welche am Aufbau des Herzmuskelgewebes beteiligt sind, und zwar insbesondere in Genen, die für Proteine der Desmosomen kodieren und als Krankheitsgene für die ARVC/D bekannt sind. Dazu zählen das DSP Gen (3 Mutationen), das DSG2-Gen (3 Mutationen), PKP2 und DSC2 (beide



je eine Mutation). Darüber hinaus konnten Genmutationen in bekannten Krankheitsgenen für die DCM und/oder HCM identifiziert werden, wie TTN (2 Mutationen), DES (2 Mutationen), LMNA (2 Mutationen), MYH7 und RBM20 (jeweils eine Mutation). Insgesamt fanden sich 70,4% aller Mutationen in Strukturgenen<sup>20</sup>, nämlich 19 Varianten in 12 Genen.

In Genen, die für kardiale Ionenkanäle kodieren und als Arrhythmie-Gene bezeichnet werden (RYR2, KCNJ2, CACNA1C, KCNH2, SCN5A, ABCC9), wurden hingegen nur 26% aller Genmutationen, d.h. sieben Varianten, identifiziert.

Folglich scheint die AUCM durch strukturelle Veränderungen des Herzens bedingt zu sein. Weitere Erläuterungen hierzu finden sich im Kapitel 4.2 der Diskussion. Darüber hinaus fand sich eine Mutation im LDLR Gen, durch welches eine Hypercholesterinämie verursacht werden kann. Diese ist der Vollständigkeit halber zusätzlich aufgeführt, weshalb sich 24 Varianten ergeben. In der untenstehenden Grafik sind die Gene proportional zu den aufgetretenen Mutationen (Klasse 4 und 5) dargestellt.



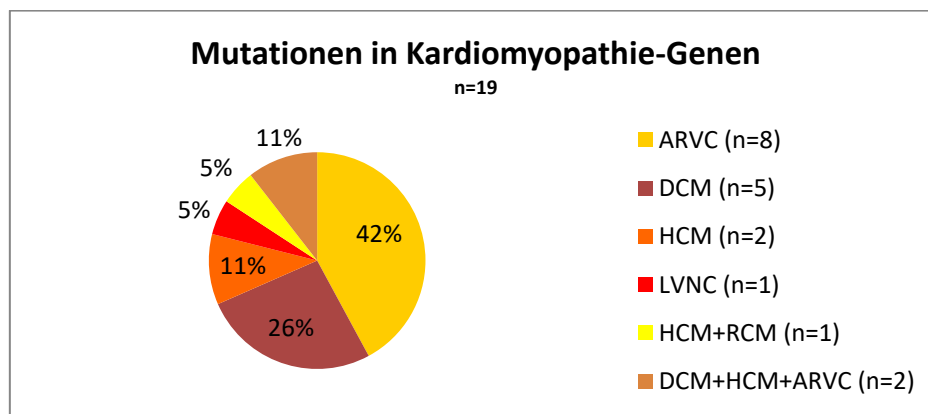
**Abbildung 34: Darstellung der Gene, in denen Mutationen identifiziert wurden, entsprechend ihrer Kausalität für Arrhythmien bzw. Kardiomyopathien**

<sup>20</sup> MYBPC3, DSP, PKP2, MYH7, LMNA, DSG2, RBM20, DTNA, ACTN2, TTN, DES, DSC2

Von den 12 Genen, welche als kausal für Kardiomyopathien beschrieben sind und in denen sich eine wahrscheinlich kausale Mutation fand, waren

- vier Gene (DSG2, PKP2, DSP, DSC2) kausal für eine ARVC
- drei Gene (LMNA, DES, RBM20) kausal für eine DCM
- zwei Gene (ACTN2, MYBPC3) kausal für eine HCM
- ein Gen (DTNA) kausal für eine LVNC (Linksventrikuläre Non-Compaction Kardiomyopathie)
- sowie zwei Gene kausal für mehrere Kardiomyopathieformen (MYH7 für HCM und RCM, TTN für DCM, HCM und ARVC) (51).

In der untenstehenden Abbildung 35 sind die Kardiomyopathien proportional zu den detektierten Varianten (nur Mutationen, ohne VUS) dargestellt.

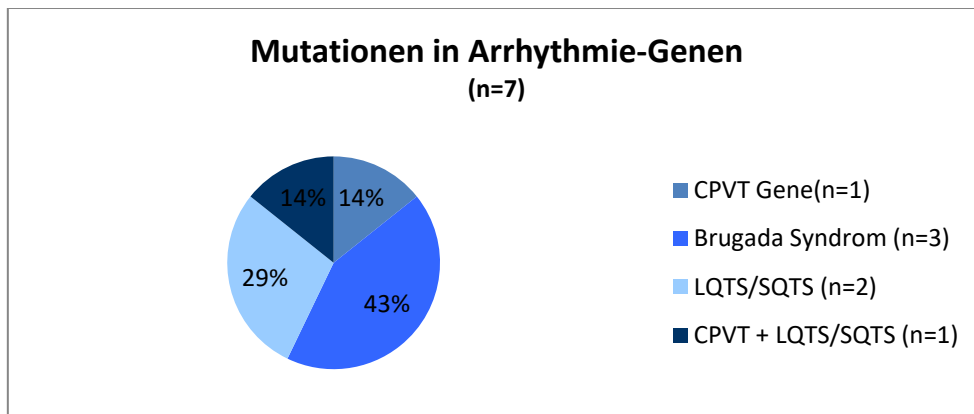


**Abbildung 35: Aufteilung der 19 Varianten der Klassen 4 und 5 entsprechend der durch das Gen verursachten Kardiomyopathie**

Von den sechs Arrhythmien verursachenden Genen, in denen sich eine möglicherweise kausale Mutation fand, waren

- ein Gen (RYR2) für CPVT
- zwei Gene (ABCC9, SCN5A) für das Brugada-Syndrom
- zwei Gene (CACNA1C, KCNH2) für SQTS und/oder LQTS
- ein Gen (KCNJ2) für CPVT und LQTS/SQTS kausal (51).

In der untenstehenden Abbildung 36 sind die Verhältnisse proportional zu den detektierten Varianten (nur Mutationen, ohne VUS) dargestellt.



**Abbildung 36: Aufteilung der sieben Varianten der Klasse 4 und 5 entsprechend der durch das Gen verursachten Arrhythmie**

Zusammenfassend ist die AUCM eine kausal-heterogene Erkrankung, die durch eine Vielzahl an Genen bedingt ist, vorwiegend aber durch Strukturgenen und zwar insbesondere durch solche, welche auch kausal für die ARVC/D sind. In den ARVC/D-typischen Genen (DSG2, PKP2, DSP, DSC2) fanden sich 30% aller detektierten potentiell-kausalen Varianten. Zudem ist die hohe Sensitivität der durchgeführten Analysen hervorzuheben: Die Sensitivität der Panel-basierten Sequenzanalyse lag in Bezug auf das gesamte AUCM Patientenkollektiv bei 61,4%. Dieses hohe Ergebnis kann als deutlicher Hinweis dafür gesehen werden, dass diese Erkrankung zum großen Teil genetisch bedingt ist.

### 3.2 Etablierung der *Multiplex* HRM-PCR zum Ausschluss von Probenverwechslungen in der NGS Diagnostik

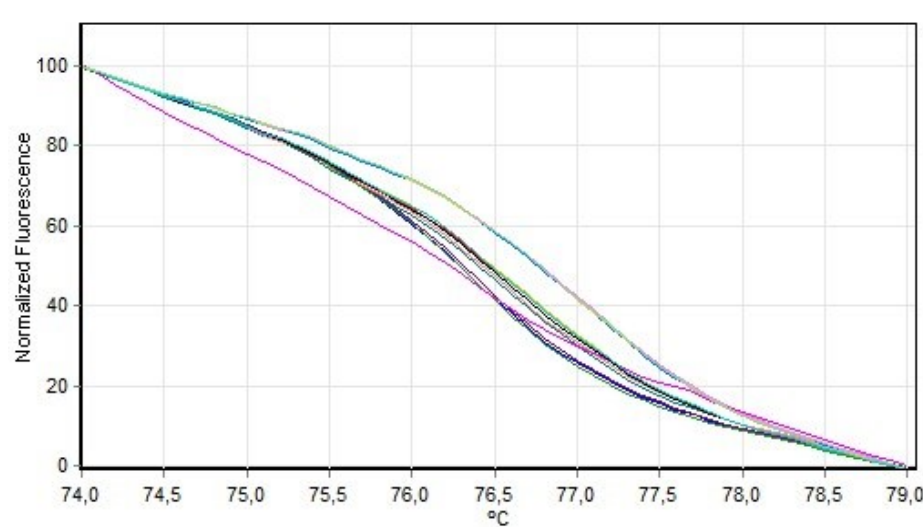
Ein zweites Ziel dieser Arbeit bestand darin eine Methode zu etablieren und zu validieren, mit welcher überprüft werden kann, ob es im Rahmen der *NGS library* Präparation, bei der bis zu zehn Patienten parallel untersucht werden, Proben vertauscht worden sind.

Hierzu wurden bei der ursprünglich zur *library*-Präparation verwendeten Patienten DNA acht verschiedene SNPs, die in Genen des *Cardio Panels* der *MiSeq*<sup>®</sup> vorkommen, mittels *High Resolution Melting* (HRM) bestimmt. Die Genotypisierung erfolgte mit zwei *Multiplex*-HRM-PCR Ansätzen, in der jeweils vier verschiedene Primerpaare zur Untersuchung von vier unterschiedlichen SNPs eingesetzt wurden. Nach Abschluss der Genotypisierung erfolgte ein Vergleich zwischen den Ergebnissen der *MiSeq*<sup>®</sup> und der HRM-PCR. Pro Analysenlauf können maximal vier verschiedene SNP untersucht werden, daher war die Aufteilung in zwei Läufe erforderlich.

Zur Validierung der Methode wurden die vierzehn DNA-Proben analysiert, welche zuvor bereits in der Panel-basierten Exomsequenzierung eigenständig analysiert worden waren und deren Genotyp bekannt war. Nun sollte überprüft werden, ob der in der *MiSeq*<sup>®</sup> festgestellte Genotyp mit den Ergebnissen der HRM-PCR übereinstimmt. Über eine statistische Modellrechnung sollte zudem berechnet werden, mit welcher Wahrscheinlichkeit davon ausgegangen werden kann, dass bei identischen Genotypisierungsergebnissen eine Verwechslung der Proben ausgeschlossen werden kann.

### 3.2.1 Etablierung der Multiplex HRM Analysen – Erster Ansatz

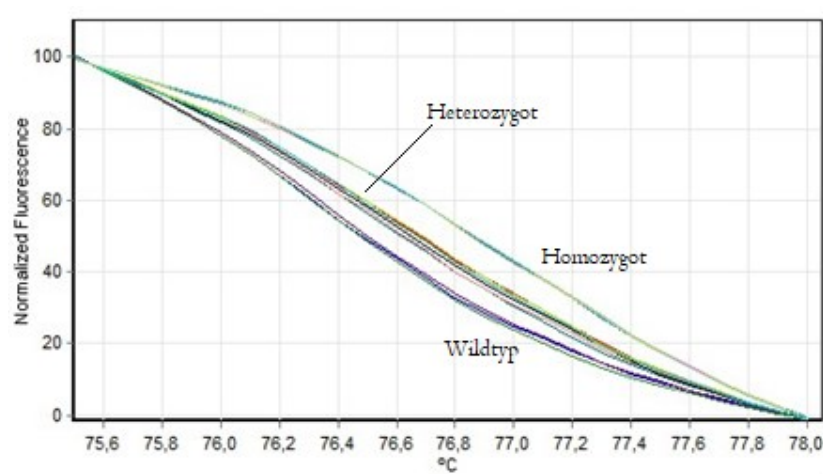
Wie bereits in Kapitel 2.3.11 beschrieben, wurden die SNPs zur Überprüfung so ausgewählt, dass ihre drei möglichen Ausprägungen (Wildtyp/heterozygot/homozygot) etwa gleich häufig in der Bevölkerung vertreten sind. Im ersten Ansatz wurden vier SNPs, die in den Genen DES, KCNH2, MYH7 und MYH6 vorkommen, simultan analysiert. In der untenstehenden Abbildung 37 ist die Schmelzkurve der HRM-PCR zu sehen.



**Abbildung 37: Normalisierte Schmelzkurve der HRM-PCR mit vier SNPs (*rs1058261*, *rs1805120*, *rs7157716*, *rs365990*)**

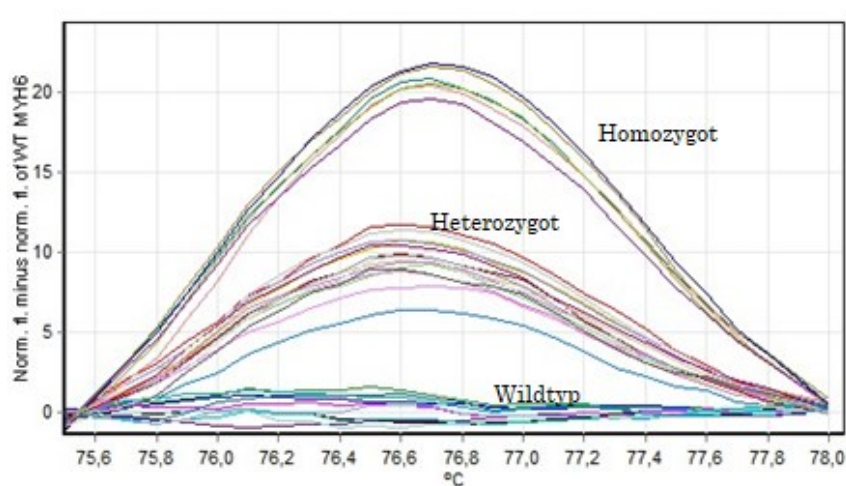
Nachfolgend wurden die SNP-spezifischen Temperaturintervalle eingestellt, wodurch eine spezifischere Analyse möglich war.

## Darstellung des rs365990-SNPs (MYH6)

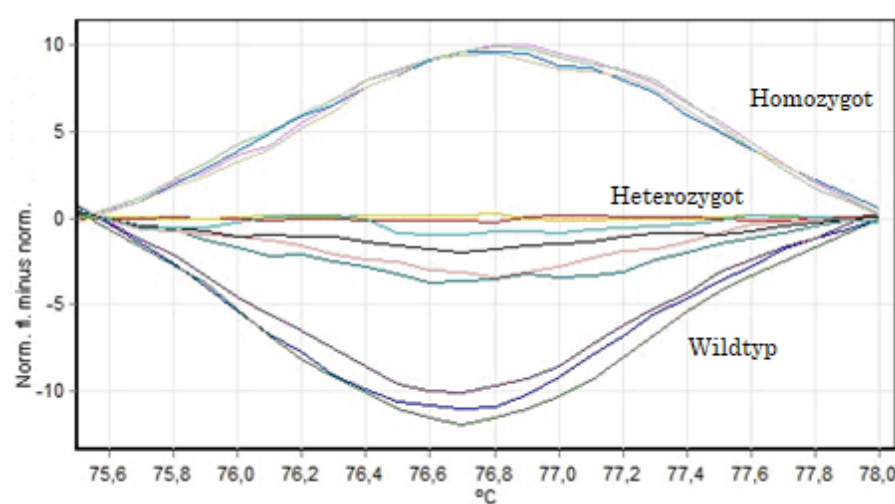


**Abbildung 38: Normalisierte Schmelzkurve des rs365990-SNPs (MYH6)**

Der rs365990-SNP (MYH6) stellte sich, aufgrund des temperaturspezifischen Schmelzpunktes der synthetisierten Fragmente, im Intervall von 75,6 – 78°C dar. Wie in Abb. 38 dargestellt ergeben sich abhängig von der Basensequenz drei verschiedene Schmelzkurven, je nachdem ob der Genotyp in der hetero-, homozygoten oder wildtypen Form vorliegt. Durch den Vergleich der Schmelzkurve einer Probe mit den Schmelzkurven von Referenzproben kann die exakte Identifizierung des Genotyps erfolgen. In Abbildung 39 zu sehen ist der rs365990-SNP (MYH6), bei welchem die Wildtypen normiert sind. Die mittleren Kurven stellen die heterozygoten Genotypen dar und die oberen die homozygoten Genotypen.



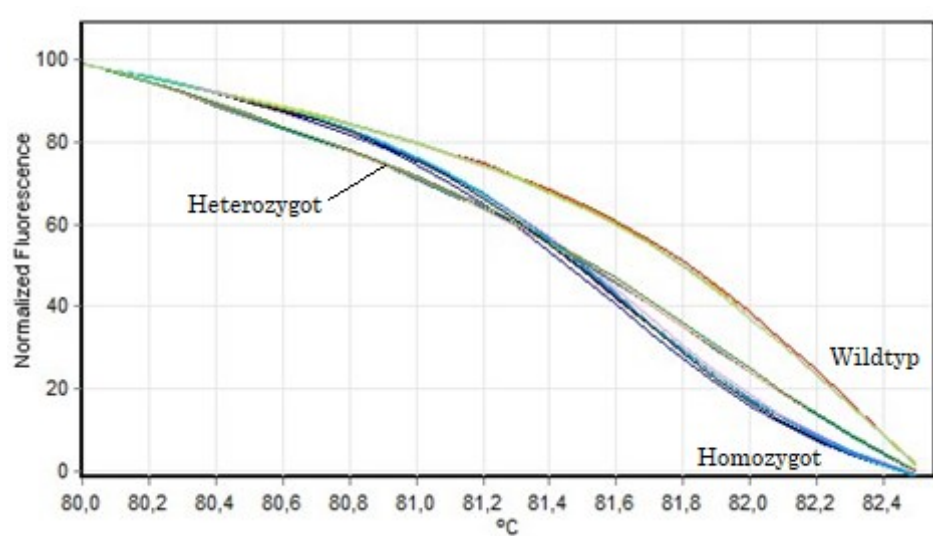
**Abbildung 39: HRM-PCR mit MiSeq®-Proben (SNP: rs365990)**



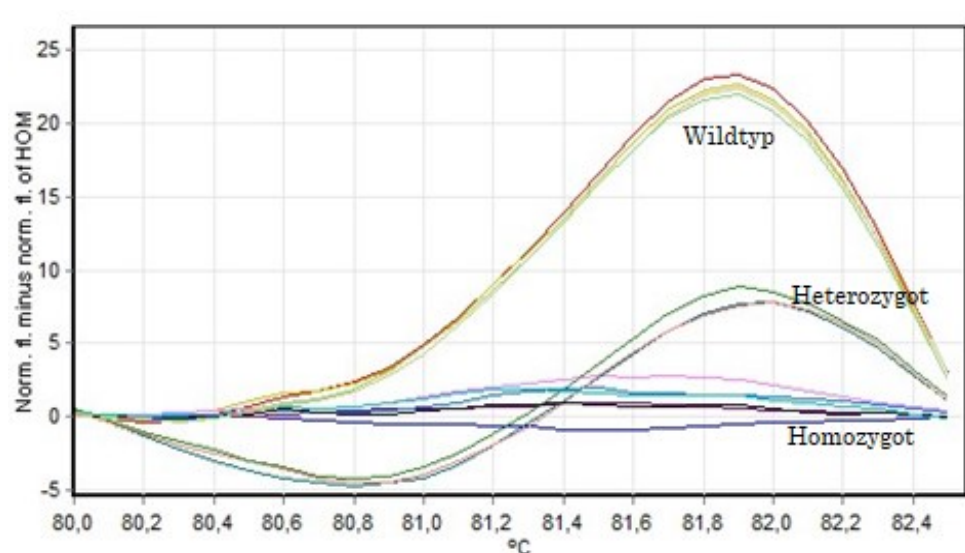
**Abbildung 40: Schmelzkurve des rs365990-SNPs (MYH6)**

In der oben dargestellten Abbildung 40 wurde eine Probe mit heterozygotem Genotyp als Referenzprobe genutzt, wodurch die Identifizierung der anderen Proben erfolgen konnte. So sind alle weiteren Proben, deren Schmelzkurve nahe der Mittellinie verläuft, ebenfalls dem heterozygoten Wildtyp zugehörig, wohingegen die obere Kurve den homozygoten und die untere den wildtypen Genotyp darstellt, was ebenfalls anhand von zwei Referenzproben ermittelt wird.

## Darstellung des rs1058261-SNPs (DES)



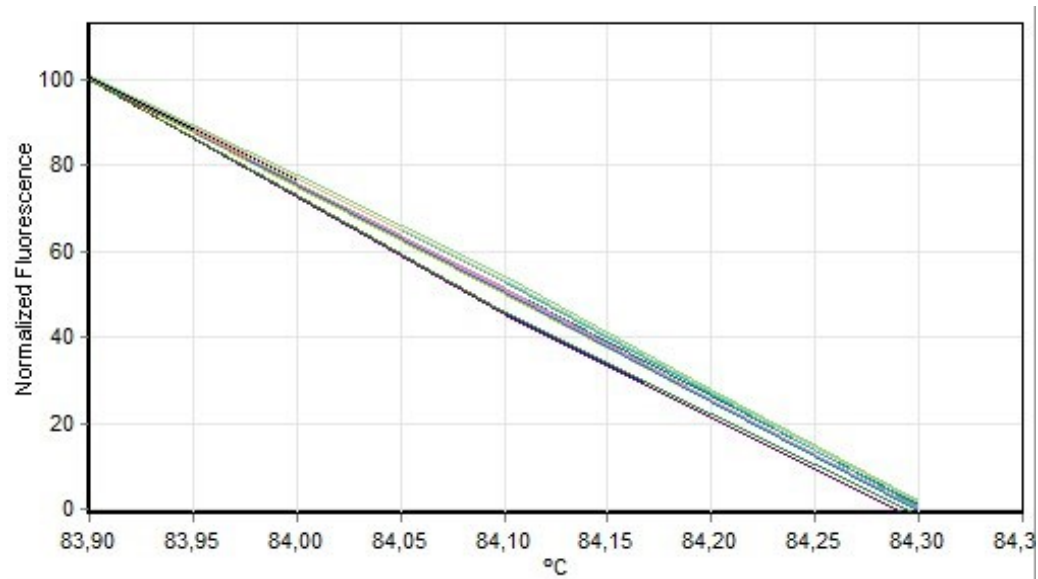
**Abbildung 41: Normalisierte Schmelzkurve des rs1058261-SNPs (DES)**



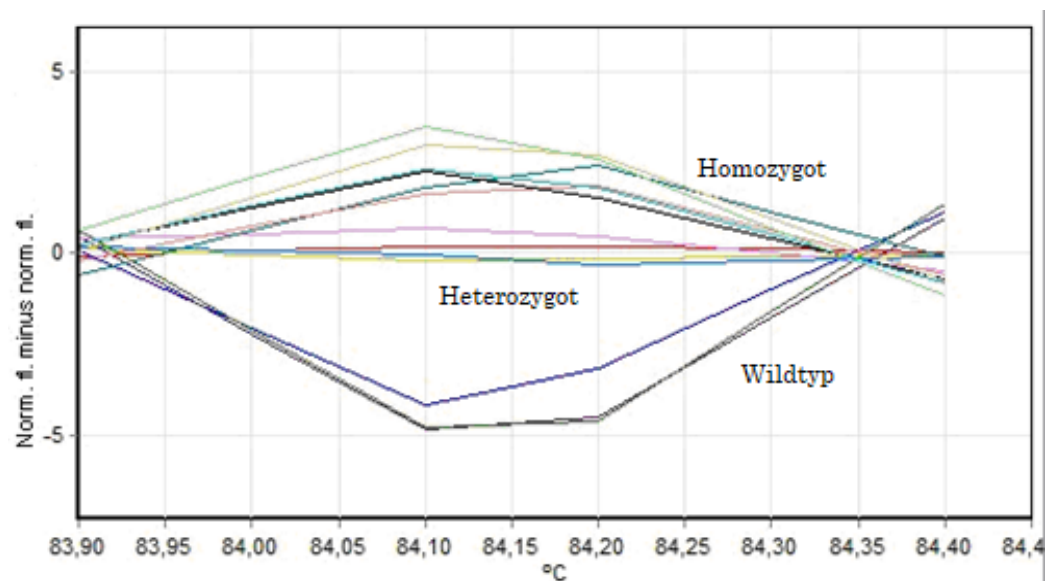
**Abbildung 42: Schmelzkurve des rs1058261-SNPs (DES) im Intervall von 80-82,4°C**

In den beiden obenstehenden Abbildungen 41 und 42 sind Schmelzkurven des rs1058261-SNPs (DES) dargestellt, wobei bereits optisch eine eindeutige Unterscheidung der Genotypen möglich ist. Ebenso bestätigte die HRM-PCR-Software die Zugehörigkeit zu den jeweiligen Genotypen mit einer Sicherheit von über 95%. In Abbildung 42 stellt die Kurve der Mittellinie dabei den homozygoten Wildtyp dar, wobei die obere Kurve die Proben des Wildtyp-Genotyps repräsentiert und die kubische Funktion die des heterozygoten.

## Darstellung des rs7157716-SNPs (MYH7)



**Abbildung 43: Normalisierter Graph des rs7157716-SNPs (MYH7)**

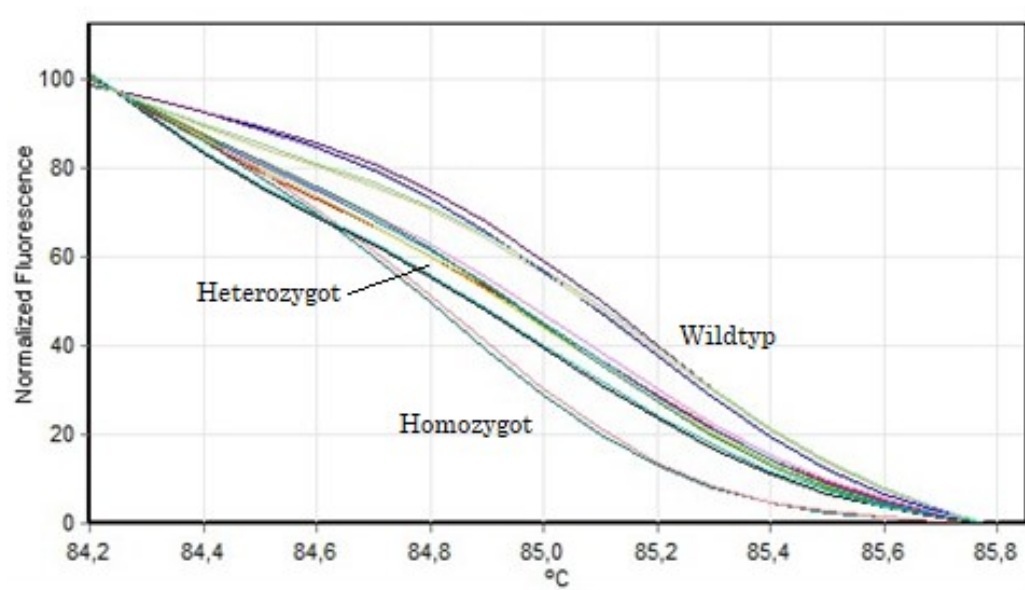


**Abbildung 44: Darstellung der Schmelzkurven des rs7157716-SNPs (MYH7)**

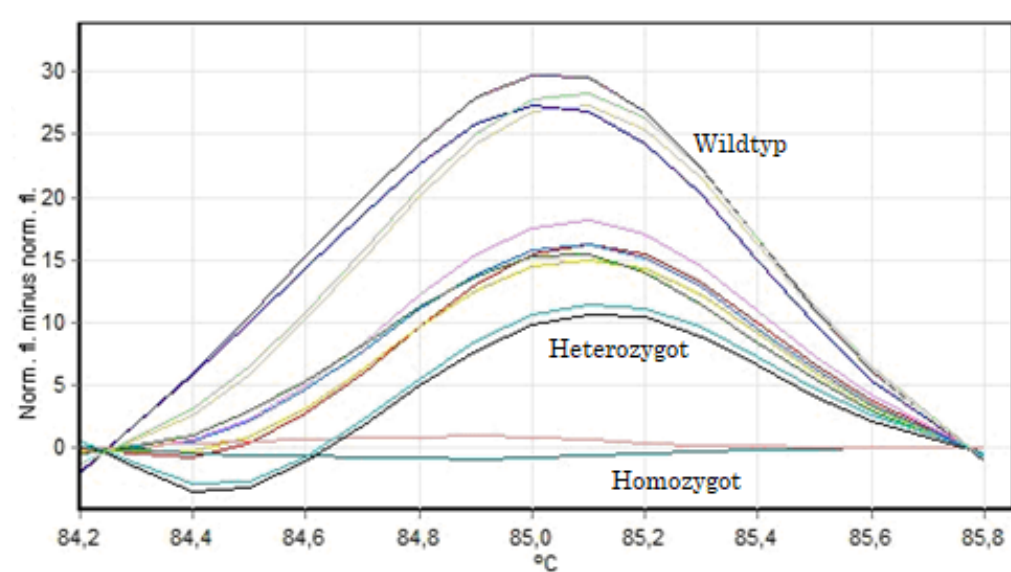
Wie man bereits in Abbildung 43 sieht, liegt ein relativ enges Temperaturintervall (83,9-84,3°C) vor, in welchem die Schmelzkurven nur minimal voneinander divergieren. Auch in Abbildung 44, bei welcher der heterozygote Genotyp genullt wurde, erscheint der Unterschied der Schmelzkurven, insbesondere der hetero- und homozygoten, marginal. Dennoch gelang es der HRM-PCR Software die Proben mit einer Sicherheit von über 90% den richtigen Genotypen zuzuordnen. In Abbildung 44 entsprechen die oberen Kurven dem homozygoten Genotyp und die unteren dem Wildtyp.



## Darstellung des rs1805120-SNPs (KCNH2)



**Abbildung 45: Normalisierte Schmelzkurve des rs1805120-SNPs (KCNH2)**



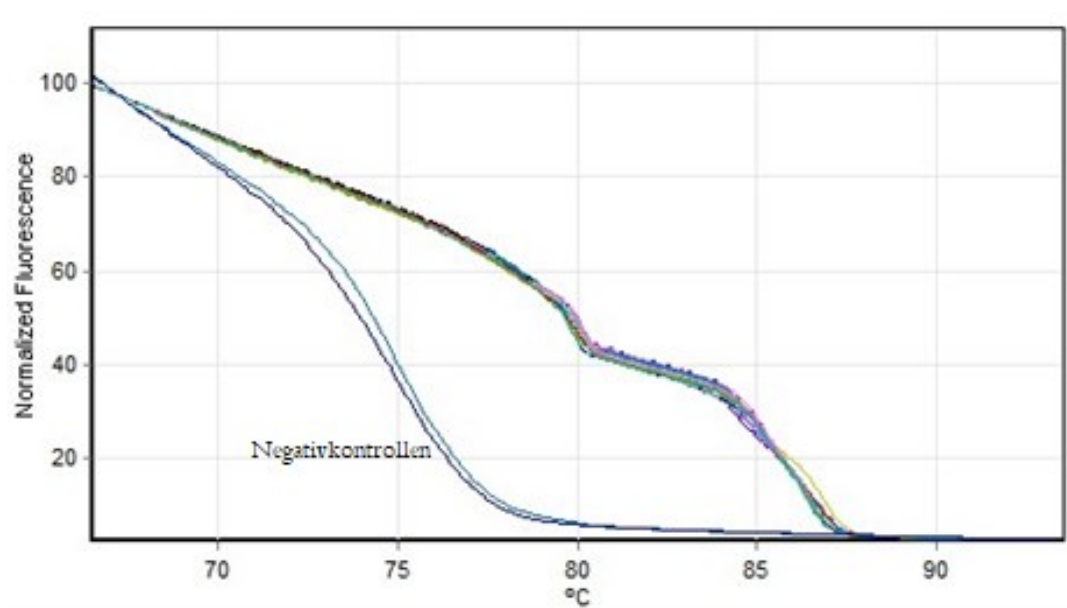
**Abbildung 46: Schmelzkurven von rs1805120 im Temperaturintervall von 84,2-85,8°C**

In Abbildung 45 ist die normalisierte Schmelzkurve des rs1805120-SNPs (KCNH2) dargestellt, dabei stellt die unterste Kurve den homozygoten Genotyp dar, die mittlere den heterozygoten und die obere den wildtypen Genotyp. In Abbildung 46 wurde der homozygote Genotyp genullt. Die mittleren Schmelzkurven entsprechen den heterozygoten Genotypen, die obere Kurve dem Wildtyp. Trotz des relativ engen Temperaturbereiches von 1,6°C können die Genotypen des rs1805120-SNPs (KCNH2) bereits optisch sicher differenziert werden.

Zusammenfassend eignen sich alle vier SNPs des ersten *run* zur Probendifferenzierung anhand des Schmelzverhaltens der DNA-Fragmente und konnten erfolgreich etabliert werden.

### 3.2.2 Etablierung der *Multiplex* HRM Analysen – Zweiter Ansatz

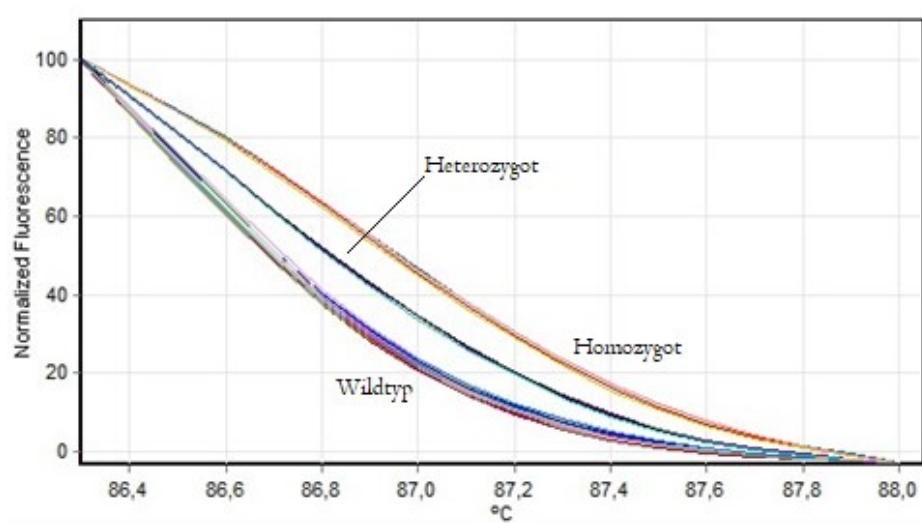
Zusätzlich wurden im zweiten Ansatz SNPs der Gene GAA, KCNH2 und AKAP9 (rs1800310, rs740952, rs28927678, rs6960867) analysiert. In der untenstehenden Abbildung 47 ist die Schmelzkurve dieser zweiten HRM-PCR zu sehen. Die zwei unteren, abweichend verlaufenden Kurven stellen die Schmelzkurven der Negativkontrollen dar.



**Abbildung 47: Schmelzkurve des HRM-PCR-Multiplex Run mit vier SNPs (rs1800310, rs740952, rs28927678, rs6960867)**

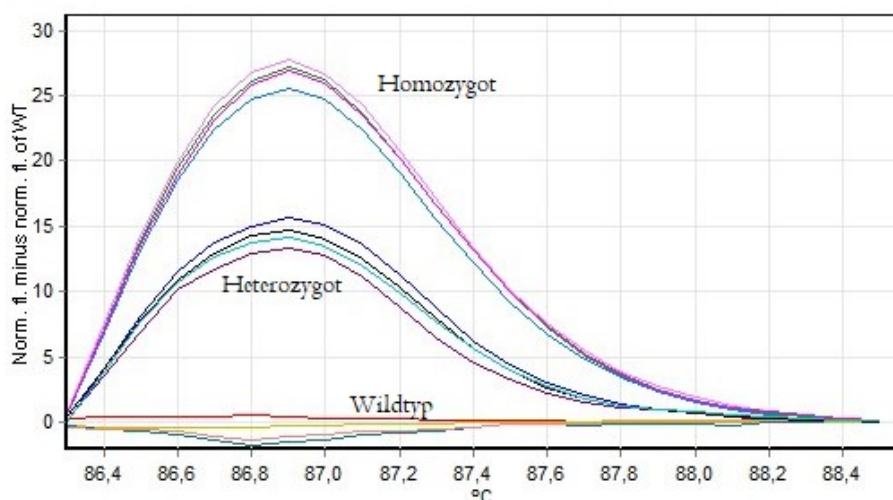
Anschließend erfolgte die einzelne Analyse der verschiedenen SNPs in ihren jeweils individuellen Temperaturbereichen.

## Darstellung des rs1800310-SNPs (GAA)



**Abbildung 48: Normalisierte Schmelzkurve des rs1800310-SNPs**

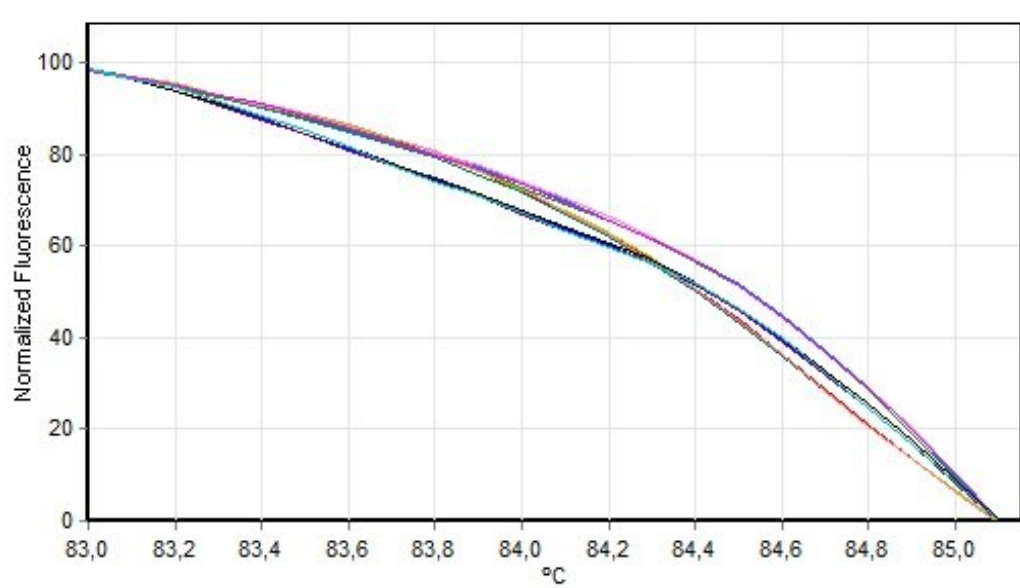
In Abb. 48 ist der normalisierte Graph des rs1800310-SNPs (GAA) zu sehen. Dabei stellt die untere Kurve die Wildtypen dar, die mittlere die heterozygoten Allelträger und die obere die homozygoten Genotypen. In dieser Ansicht wird das unterschiedliche Schmelzverhalten der Nukleinsäuren, bedingt durch die verschiedenen Genotypen, besonders deutlich.



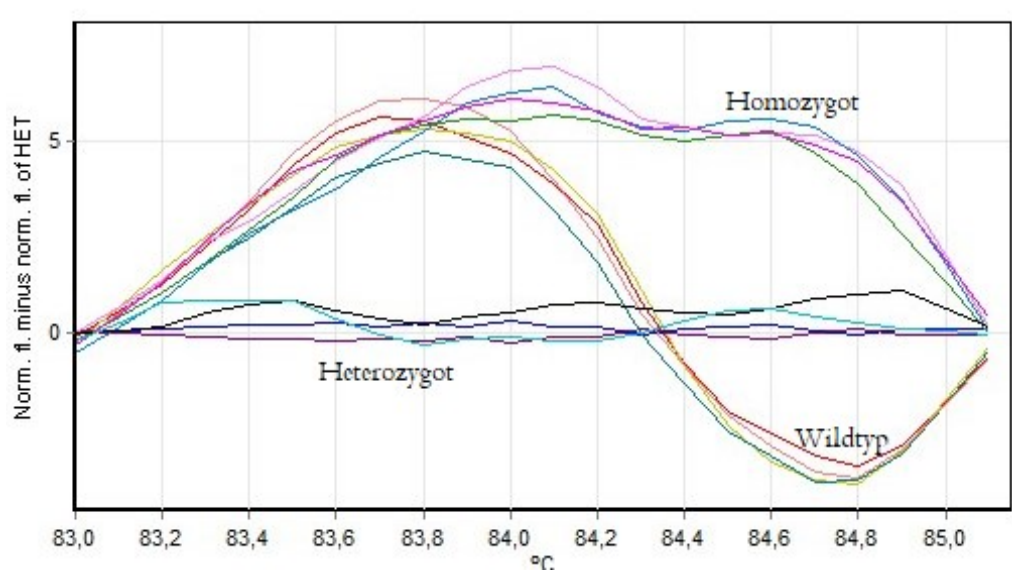
**Abbildung 49: Schmelzkurve des rs1800310-SNPs (GAA)**

Im Temperaturintervall von 86,3-88,4°C erfolgte die Analyse des rs1800310-SNPs (GAA). In Abbildung 49 wurde die Wildtyp-Referenzprobe des rs1800310-SNPs (GAA) null gesetzt, wodurch die Schmelzkurve des heterozygoten Genotyps als mittlere sowie die des homozygoten als obere Kurve dargestellt wird.

## Darstellung des rs740952-SNPs (KCNH2)



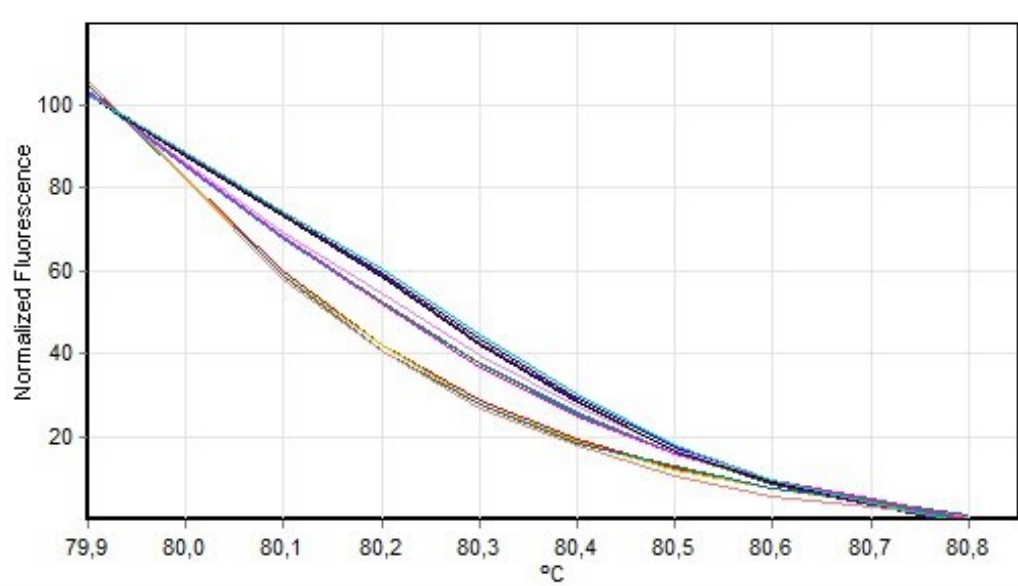
**Abbildung 50: Darstellung der normalisierten Schmelzkurve des rs740952-SNPs (KCNH2)**



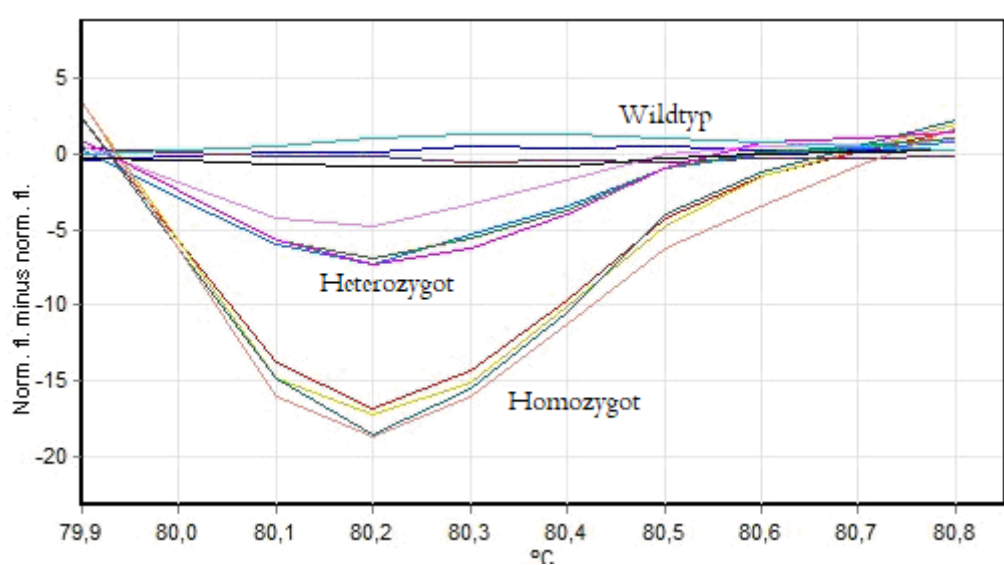
**Abbildung 51: Darstellung des rs740952-SNPs (KCNH2)**

Bereits optisch ist in den Abbildungen 50 und 51 eine eindeutige Differenzierung der Proben anhand ihres Schmelzverhaltens möglich. Durch den Vergleich der Proben mit den Genotypen bzw. den Schmelzkurven der Referenzproben kann somit zweifelsfrei, sowohl optisch als auch durch die HRM-PCR-Software, die Zuordnung des Genotyps erfolgen. In der obigen Abbildung 51 stellt die Kurve entlang der Nulllinie die heterozygoten Genotypen dar, wohingegen die kubische Funktion die Wildtypen beschreibt und die obere Kurve die homozygoten Genotypen.

## Darstellung des rs28927678-SNPs (AKAP9)



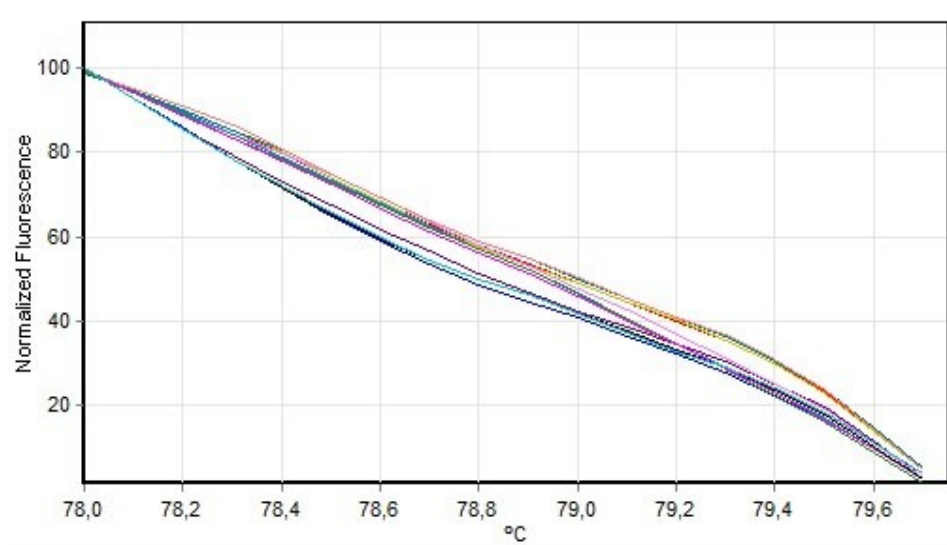
**Abbildung 52: Normalisierte Funktion des rs28927678-SNPs (AKAP9)**



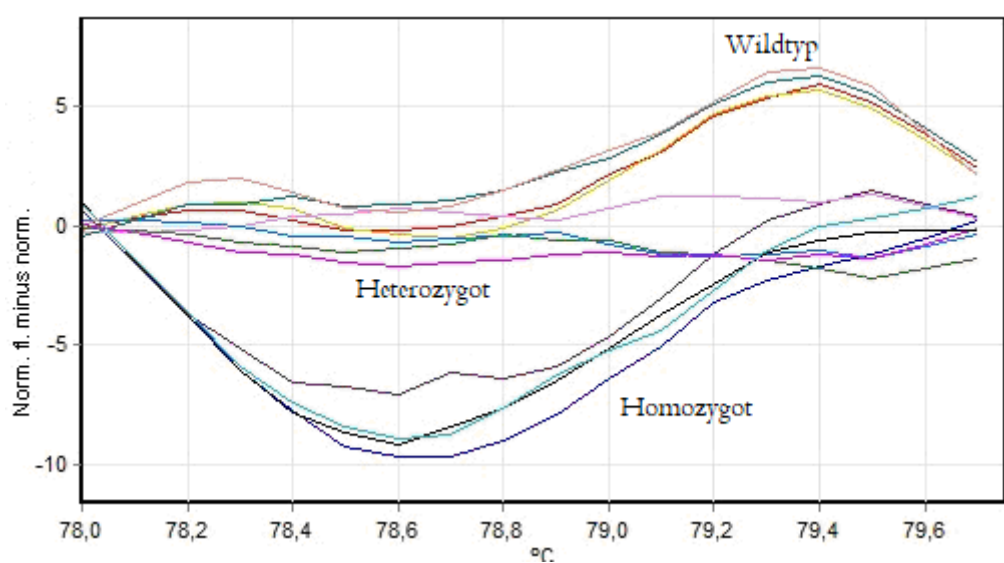
**Abbildung 53: Schmelzkurven des rs28927678-SNPs (AKAP9)**

Die Unterschiede der Schmelzkurven stellen sich, wie in Abbildung 52 und 53 zu erkennen, bei dem rs28927678-SNP (AKAP9) insbesondere im Temperaturbereich von 79,9 bis 80,8°C dar. In der obenstehenden Abbildung 53 sind die Unterschiede der Schmelzkurven entsprechend ihres Genotyps deutlich sichtbar. Die oberen Kurven stellen dabei die Wildtypen des SNPs dar, wobei die Mittleren die heterozygoten und die Unteren die homozygoten Genotypen darstellen.

## Darstellung des rs6960867-SNPs (AKAP9)



**Abbildung 54: Darstellung der normalisierten Schmelzkurve des rs6960867-SNPs (AKAP9)**



**Abbildung 55: Schmelzkurven des rs6960867-SNPs (AKAP9)**

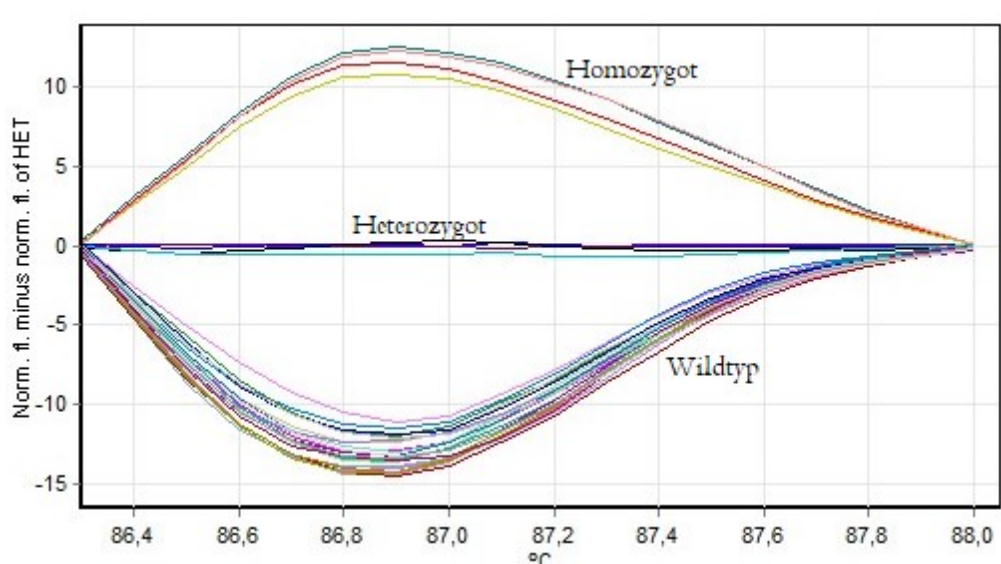
In den beiden Abbildung 54 und 55 sind jeweils die Schmelzkurven des rs6960867-SNPs (AKAP9) im Temperaturintervall von 78-79,7°C dargestellt. In Abbildung 55 entsprechen die unteren Kurven dabei den Proben mit homozygotem Genotyp und die oberen Kurven den Proben mit wildtypen Genotyp.



### 3.2.3 Validierung der *Multiplex* HRM-PCR

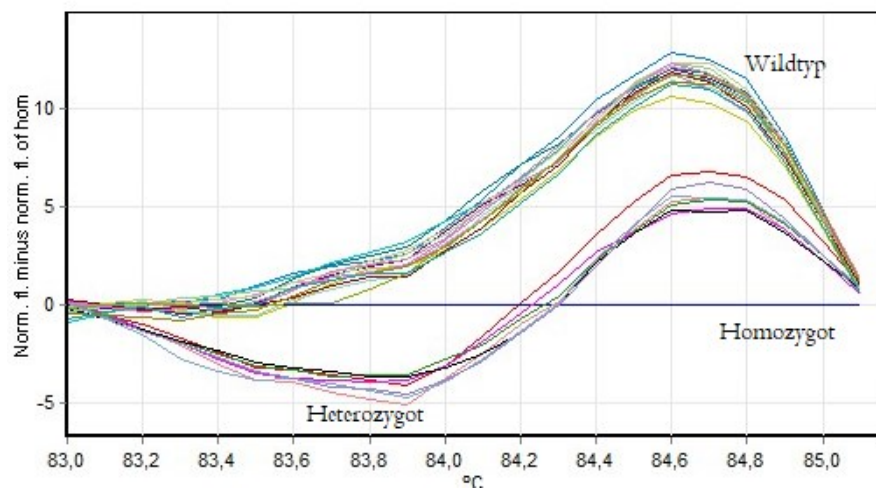
Nachdem beide Ansätze der Multiplex-HRM-PCR mit Kontrollproben zufriedenstellende Ergebnisse gezeigt hatten, wurde die Zuordnung zu den *MiSeq*<sup>®</sup>-Ergebnissen getestet. Dazu wurden zwei HRM-PCR-runs für die Überprüfung von je vier SNPs durchgeführt. So wurde ein erster HRM-PCR-Run mit vier Kontrollproben (einfache Abdeckung der Genotypen), zwei *No-Template*-Kontrollen (NTC) mit Wasser sowie zehn *MiSeq*<sup>®</sup>-Proben angesetzt. Die zehn Proben waren zuvor in einem *MiSeq*<sup>®</sup>-run eigens genotypisiert worden, nun sollte der Genotyp in der HRM-PCR bestätigt und somit eine Probenverwechslung ausgeschlossen werden. Simultan wurden zur Überprüfung der vier weiteren SNPs in einem zweiten HRM-PCR Run drei bereits etablierte Kontrollproben (zur einfachen Abdeckung des Genotyps) sowie zehn *MiSeq*<sup>®</sup>-Proben und zwei NTCs angesetzt und analysiert. Während im ersten run vier Referenzproben notwendig waren, um alle drei Genotypen der vier SNPs darzustellen, war dies im zweiten Durchlauf für die weiteren vier SNPs mit nur drei Referenzproben möglich. Weitere Informationen dazu können im Anhang (s. Tabelle 32) nachgelesen werden.

Die untenstehende Abbildung 56 zeigt exemplarisch die Ergebnisse des zweiten HRM-PCR Durchlaufs mit den vier Primern (rs1800310, rs28927678, rs6960867, rs740952) im Temperaturintervall des rs1800310-SNPs (GAA; 86,3-88°C). Dabei sind die Proben mit heterozygotem Genotyp normiert, die untere Kurve zeigt die Wildtypen und die obere Kurve die homozygoten Genotypen.



**Abbildung 56: Ergebnisse des HRM-PCR Durchlaufs bezüglich des rs1800310-SNPs mit 10 *MiSeq*<sup>®</sup> Proben und drei Kontrollen**

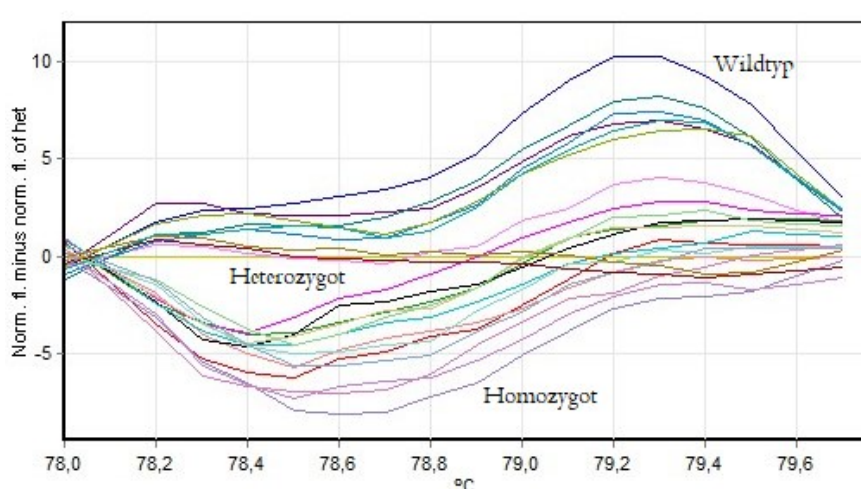
Als weitere Beispiele der Ergebnisse des Durchlaufs mit den *MiSeq*<sup>®</sup> Proben sind die Ergebnisse des rs740952-SNPs (KCNH2) in Abbildung 57 sowie die Ergebnisse des rs6960867-SNPs (AKAP9) in Abbildung 58 dargestellt.



**Abbildung 57: HRM-PCR mit *MiSeq*<sup>®</sup> Proben im Schmelzbereich des rs740952-SNPs (KCNH2)**

So ist in der obigen Abbildung 57 eine eindeutige Unterscheidung der Genotypen möglich. Dort wurde die homozygote Referenzprobe des rs740952-SNPs (KCNH2) genullt, wobei erkennbar wird, dass keine andere der *MiSeq*<sup>®</sup> Proben einen homozygoten Genotyp aufweist. Die obere Kurve entspricht den Wildtypen, wohingegen die kubische Kurve die heterozygoten Genotypen darstellt.

Zusätzlich stellt die untere Abbildung 58 sämtliche analysierte *MiSeq*<sup>®</sup> Proben dar, wobei die unteren Kurven dabei den Proben mit homozygotem Genotyp entsprechen, wie anhand der Referenzproben ermittelt werden konnte, und die oberen Kurven den Proben mit wildtypen Genotyp.



**Abbildung 58: Schmelzkurven des rs6960867-SNPs (AKAP9) mit *MiSeq*<sup>®</sup> Proben**



Zusammenfassend wurden acht SNPs etabliert, welche mithilfe der HRM sicher und einfach überprüft werden können. In der untenstehenden Tabelle 24 findet sich eine Zusammenfassung der untersuchten SNPs mit den Primern sowie der individuellen Schmelztemperaturen der Amplikone. Diese Schmelztemperaturen sind im Programm des *Rotor-Gene Q*<sup>®</sup> einzustellen, um die Genotypen der Proben identifizieren zu können.

**Tabelle 24: Eigenschaften der entworfenen Amplikone zu den SNPs sowie der Primer**

SNP	Primer	Schmelztemperatur des Amplikons (in °C)
DES rs1058261	DES+ (ATGTCTAAGCCAGACCTCACTG) DES- (CACTCCTCAGCTTCAGAAATGTTCT)	80 – 82,5
KCNH2 rs1805120	KCNH2+ (CTTCAAGGGCTGGTTCTCAT) KCNH2- (CTCTCCCTACACCACCTGCC)	84,24 – 85,8
MYH7 rs7157716	MYH7+ (GTGACCTTTGACCCTAAAGGAGA) MYH7- (TTGTCCTCCTCGGCCTGAA)	83,9 – 84,3
MYH6 rs365990	MYH6+ (CATTAAATCAGCAGAACAGTAAGATTGAG) MYH6- (TCCTTCAGTTTCTTCTGTAGTTGAAG)	75,5 – 78
GAA rs1800310	GAA+ (TGCGCTACGCCTCTCC) GAA- (TAGGTCACTCACTCCAGGAAGAGG)	86,3 – 88,5
KCNH2 rs740952	KCNH2+ (TCAATGCCAACGAGGAGGTG) KCNH2- (CGGCCACCATGTCGATGA)	83-85,1
AKAP9 rs28927678	AKAP9+ (CAGACTGGCGAGGRGAACACTAC) AKAP9- (CCTGTTCTTGATTCTCTGTCCAAAC)	79,9-80,8
AKAP9 rs6960867	AKAP9+ (TGAGCCACTTCCTATAAACTGAGTAAG) AKAP9- (CTTCTTCTGAGGAACATCACTCTGTAA)	78-79,7

Mithilfe der HRM-PCR Software von *Qiagen*<sup>®</sup> ist neben der optischen Differenzierung auch ein Auswerten anhand vom Computer berechneter Zugehörigkeit möglich. Dabei berechnet die Software anhand des Schmelzverhaltens die Sicherheit, mit welcher eine Probe zu einer der Referenzkurven zugehörig ist. Folgend findet sich eine Tabelle, in welcher der in der *MiSeq*<sup>®</sup> ermittelte Genotyp eines Patienten (grün markiert) sowie der mittels HRM-PCR ermittelten Genotyp (blau markiert) mit der entsprechenden Sicherheit gegenübergestellt werden. Da jede Probe jeweils zweifach analysiert bestimmt wird, ergibt sich die angegebene Sicherheit aus dem Durchschnitt der Sicherheiten beider Analyseergebnisse.

**Tabelle 25: Gegenüberstellung des in der *MiSeq*<sup>®</sup> ermittelten Genotyps (grün markiert) mit dem in der HRM-PCR ermittelten Genotyp (blau markiert, Richtigkeit ist angegeben in %)**

Proben-ID	MYH7 (rs7157716)	KCNH2 (rs1805120)	DES (rs1058261)	MYH6 (rs365990)	GAA (rs1800310)	KCNH2 (rs740952)	AKAP9 (rs28927678)	AKAP9 (rs6960867)
11129-3	WT WT 99,2%	WT WT 99,3%	HET HET 99,6%	WT WT 98,86%	WT WT 96,92%	WT WT 99,83%	HOM HOM 96,4%	HOM HOM 94,7%
12083-1	HET HET 92,5%	WT WT 91,48%	HET HET 99,5%	WT WT 99,38%	HET HET 92,1%	WT WT 98,83%	HOM HOM 95,6%	HOM HOM 97,4%
12254-1	HET HET 96,2%	HET HET 94,6%	HET HET 99,4%	HET HET 95,9%	WT WT 99,29%	HET HET 99,8%	WT WT 98,39%	WT WT 96,63%
12343-1	WT WT 99,1%	HET HET 91,7%	WT WT 98,2%	WT WT 99,3%	WT WT 98,71%	HET HET 99,4%	WT 1x WT 96,8% 1x HET 98%	WT WT 89%
12336-1	HOM HOM 99,5%	WT WT 89,64%	HET HET 99,5%	HET HET 98%	WT WT 98,72%	WT WT 99,05%	WT WT 98,4%	WT WT 97,1%
12314-1	WT WT 98,23%	WT WT 99,76%	HET HET 99,4%	HET HET 95,4%	WT WT 99,7%	WT WT 99,38%	WT WT 98,95%	WT WT 96,8%
12260-1	HET HET 97,97%	HET HET 99,4%	WT WT 99,53%	HOM HOM 98,7%	WT WT 95,43%	HET HET 99,4%	WT WT 95,1%	WT WT 96,61%
12124-1	HET HET 96,85%	WT WT 97,35%	HET HET 99,5%	WT WT 98,65%	WT WT 97,96%	WT WT 99,2%	WT WT 98,6%	WT WT 98,7%
12644-1	HOM HOM 99,45%	WT WT 81,6%	WT WT 98,9%	HOM HOM 98%	WT WT 96,49%	WT WT 99,09%	HET HET 97,4%	HET HET 97,1%
10915-3	HET HET 99,53%	WT WT 97,02%	HOM HOM 99,5%	HET HET 97,1%	HOM HOM 96,8%	WT WT 93,45%	HET HET 99,53%	HET HET 96,48%
12421-1	HET HET 95,12%	WT WT 94,6%	WT WT 97,33%	HET HET 93%	WT WT 98,71%	WT WT 98,73%	HOM HOM 98,7%	HOM HOM 96,8%
12215-1	WT WT 93,21%	WT WT 94,6%	HET HET 99,5%	HET HET 98,3%	WT WT 99,2%	WT WT 96,85%	HOM HOM 99,53%	HOM HOM 99,2%
12332-1	HET HET 99,2%	WT WT 96,45%	WT WT 96,85%	HET HET 97,4%	HET HET 96,9%	WT WT 98,9%	HOM HOM 96,85%	HOM HOM 99,53%
1616-1	WT WT 99,53%	HET HET 96,6%	HET HET 99,5%	WT WT 98,23%	HET HET 99,2%	HET HET 99,5%	WT WT 99,2%	WT WT 96,85%

Es zeigte sich, dass mit einer Sicherheit zwischen 81,6% und 99,8% alle in der HRM-PCR ermittelten Genotyp auch denen in der *MiSeq*<sup>®</sup> ermittelten entsprachen. Als Mittelwert ergab sich eine mittlere Sicherheit von 97,43% bei den Läufen. Insgesamt zeigte sich bei zweifacher Überprüfung von 14

Probenpaaren, das heißt bei 28 Ansätzen, nur einmal eine Abweichung des identifizierten Genotyps von zwei Proben (s. rote Markierung in der Tabelle). Bei dieser Probe liefen die Kurven der identischen Proben nicht ganz exakt überlappend. Durch visuelle Kontrolle konnte die Probe jedoch eindeutig dem Wildtyp zugeordnet werden. Dieser wurde bei dieser Probe auch in der *MiSeq*<sup>®</sup> detektiert. Die *accuracy* dieses Methodenlaufs, die sog. technische *accuracy* (variable Quote zutreffender Ergebnisse eines Analysenlaufes), lag somit bei 27/28, was 96,4% entspricht. Von der technischen *accuracy* eines einzelnen Probenlaufes ist die *design accuracy* der gesamten Methode abzugrenzen, welche im folgenden Kapitel 3.2.4 erläutert wird.

Zusammenfassend bestätigten beide HRM-PCR Durchläufe, dass alle in der *MiSeq*<sup>®</sup> ermittelten Genotypen mit dem Ergebnis der HRM-PCR übereinstimmten und somit (sehr wahrscheinlich) keine Verwechslung stattgefunden hat. Zusätzlich zu dieser technischen *accuracy* von 96,4% muss die allgemeine Wahrscheinlichkeit der Methode selbst, die *design accuracy*, berücksichtigt werden.

### **3.2.4 Berechnung der *design accuracy***

Die Berechnung der Sicherheit der hier etablierten Methode erfolgte in Kooperation mit dem Institut für Biometrie und Klinische Forschung Münster. Die ausführliche Erläuterung der Berechnung ist im Kapitel 2.3.12 nachzulesen. Zusammenfassend musste berechnet werden, wie hoch die Wahrscheinlichkeit ist, dass bei simultaner Überprüfung von acht SNPs keine der untersuchten Proben dieselbe Genotypen-Kombination aufweist. Nur bei ausreichend hoher Sicherheit kann eine zweifelsfrei richtige Zuordnung der *MiSeq*<sup>®</sup>-Ergebnisse zu den Patienten gewährleistet werden.

Im ersten Schritt wurden die Wahrscheinlichkeiten für das Auftreten der einzelnen Genkombinationen berechnet. Diese Wahrscheinlichkeit ergibt sich aus den Häufigkeiten der Genotypen. Die Daten diesbezüglich entstammen den Angaben von *NCBI*. Multipliziert man anschließend die ( $3^8=$ ) 6.561 Einzelwahrscheinlichkeiten, dass bei 10 Proben keine Probe die identische Ausprägung in den acht SNPs hat, erhält man die Gesamtwahrscheinlichkeit von 95,15%, dass jede Probe eine individuelle Ausprägung hat. Dies entspricht der Sicherheit, dass keine der zehn überprüften Proben in allen acht SNPs zweimal denselben Genotyp aufweist und somit jede Probe zweifelsfrei einem Patienten zugeordnet werden kann.

Entsprechend der oben erläuterten Berechnungen (s. auch Kapitel 2.3.12) liegt die Wahrscheinlichkeit der korrekten Probenzuordnung bei 95,15%. Folglich kann durch die vorgestellte Methode eine Verwechslung von Proben mit einer 95,15%igen Wahrscheinlichkeit (sog. *design-accuracy*) ausgeschlossen werden, sofern eine 100% technische *accuracy* vorliegt.

## 4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob die AUCM eine genetisch bedingte Erkrankung ist, und wenn ja, wie groß der Anteil einer genetischen Disposition bei dieser Erkrankung ist und welche Krankheitsgene an der Ätiologie beteiligt sind. Im Folgenden wird die Ätiologie der AUCM in Bezug auf die Genetik sowie die Rolle der Gendiagnostik bei einem Verdacht auf eine AUCM diskutiert. Ebenso wird das Problem der Probenvertauschung im Rahmen der NGS-Vorbereitungen diskutiert.

### 4.1 Die AUCM kann genetisch bedingt sein

Die arrhythmogene unklassifizierte Kardiomyopathie ist ein heterogenes Krankheitsbild, dessen phänotypische Ausprägung bezüglich Alter und Schwere bei den hier untersuchten Patienten variiert. Ebenso zeigte sich, dass eine unvollständige sowie viel mehr eine altersabhängige und variable Penetranz vorliegt. Diese Daten stehen in Übereinstimmung mit Erkenntnissen der *European Society of Cardiology*, welche die Penetranz der ähnlichen *arrhythmogenic cardiomyopathy* (s. Kapitel 4.3) als inkomplett beschreibt (22). Eine altersabhängige und variable Penetranz bedeutet, dass ein Individuum mit der krankheitskausalen Genmutation eine deutlich höhere Wahrscheinlichkeit hat, den klinischen Phänotyp der AUCM mit steigendem Alter zu entwickeln, auch wenn der Patient zum gegenwärtigen Zeitpunkt noch klinisch unauffällig ist (51).

In dieser Arbeit konnte bei 40% der AUCM-Patienten des IfGH eine kausale Genmutation (Klasse 4 und 5 Varianten) sowie bei 20% eine möglicherweise kausale Mutation (Klasse 3 Variante) identifiziert werden. Damit zeigt sich die Sensitivität für die Detektion einer Genmutation bei der AUCM vergleichbar mit der Sensitivität anderer Kardiomyopathieformen. So wird z. B. bei der CPVT bei etwa 35% der Patienten keine genetische Ursache bei phänotypisch eindeutiger Erkrankung detektiert (22). Ebenso konnte in mehreren Studien bei ARVC/D-Patienten auch nur bei zwischen 30 bis 70% der Fälle eine eindeutig kausale Mutation detektiert werden (58-62). Bei der DCM wird die Sensitivität einer genetischen Testung ebenfalls nur mit 15-25% angegeben, nicht zuletzt aufgrund der hohen Anzahl an in Frage kommenden Genen (51).

Darüber hinaus verbleibt vermutlich auch bei 174 Genen des *Illumina TruSight Cardio® Genpanels* dennoch eine gewisse Anzahl von nicht-untersuchten Genen, welche durchaus pathogen für die AUCM sein könnten. So würde beispielsweise bei einem Patienten mit kardialer Symptomatik und hochpositiver Familienanamnese für den plötzlichen Herztod o.ä. eine familienbasierte Exomanalyse

Sinn machen, um darüber eine pathogene Genmutation detektieren und künftig potenzielle Mutationsträger in der Familie einfach und schnell testen zu können. Zudem muss berücksichtigt werden, dass über die in dieser Arbeit eingesetzten Panelsequenzierungen nur die kodierenden Abschnitte eines Gens untersucht werden können, das heißt Genmutationen in für die Genexpression wichtigen Genabschnitten (Promotorregionen, Enhancer) werden nicht detektiert. Das Gleiche gilt für Deletionen oder Insertionen von ganzen Exonen eines Gens (*copy number variations*), die bei einigen der untersuchten Krankheitsgene einen Anteil von > 1% der Mutationen ausmachen und technisch bedingt nicht detektiert wurden (63).

Darüber hinaus variiert wie auch bei der DCM die Penetranz der AUCM von Individuum zu Individuum, sogar innerhalb derselben Familie, wenn exakt dieselbe Genmutation vorliegt (51). Anhand der variablen Penetranz der AUCM wird die additive Rolle der weiteren Faktoren, wie Umweltfaktoren oder Lebensgewohnheiten deutlich. Davon abhängig muss ebenso wie bei der DCM nicht jeder Mutationsträger unbedingt klinisch auffällig werden.

Nun ist es so, dass bei 35 von 57 AUCM Patienten eine kausale oder zumindest eventuell kausale Genvariante (Klasse 3-5) detektiert werden konnte. Aufgrund dieser hohen Sensitivität der genetischen Sequenzierung kann derzeit davon ausgegangen werden, dass der Hintergrund der AUCM ein genetischer ist. Somit kann die Frage, ob ein Screening von Risiko-Patienten auf AUCM-kausale Gene mittels Genpanel sinnvoll bzw. indiziert wäre, eindeutig bejaht werden. Als AUCM Risiko-Patienten werden dabei solche bezeichnet, die eindeutige Anzeichen einer Kardiomyopathie/arrhythmogenen Erkrankung haben, ohne dass diese genau klassifiziert werden kann, oder aber eine hochpositive Familienanamnese bezüglich plötzlicher Herztode/kardiomyopathischer Erkrankungen aufweisen. Diese Empfehlung kongruiert mit den meisten anderen Empfehlungen der *Heart Rhythm Society* (HRS) und der *European Heart Rhythm Association* (EHRA) zur genetischen Testung von Indexpersonen, welche mit Kardiomyopathien auffallen (51).

## 4.2 Mutationen in Strukturgenen bedingen Kardiomyopathien

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Veränderungen in 12 Strukturgenen (von insgesamt 18 Genen mit detektierten Varianten) gefunden, in denen Varianten als kausal für Kardiomyopathien beschrieben werden. Insgesamt beträgt der Anteil von potentiell krankheitsverursachenden Genvarianten in Strukturgenen 70,4%, bezogen auf alle pathogenen Varianten (17 von insgesamt 24 Varianten).

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die AUCM vor allem einen strukturellen Hintergrund hat und durch Veränderungen des Herzmuskelaufbaus verursacht wird, wodurch es erst sekundär zu Entstehungen von Arrhythmien kommt. Insbesondere relevant scheinen die ARVC/D-typischen Gene (DSG2, PKP2, DSP, DSC2) zu sein, in welchen sich 30% aller detektierten Mutationen fanden. Zudem sind 19% der detektierten Varianten den DCM-typischen Genen (u.a. LMNA, DES, RBM20) zuzuordnen.

Stützend für diese These ist auch der Umstand, dass bei zahlreichen AUCM-Patienten strukturelle Veränderungen im Kardio-MRT oder in der transthorakalen Echokardiographie gefunden wurden, die für phänotypische Überschneidungen mit der DCM oder ARVC/D sprechen: so fanden sich bei einer Vielzahl der bildgebend-untersuchten Patienten, genauer gesagt bei 61% des Patientenkollektivs, eine Dilatation der Ventrikel, eine fibromuskuläre Umwandlung des Myokards und/oder eine Hypertrabekularisierung, wie es bei der ARVC/D typisch ist. Dennoch waren die Befunde nicht ausreichend für eine Diagnosestellung einer DCM bzw. ARVC/D.

Bei 39% der Patienten konnte hingegen keine strukturellen Pathologien gefunden werden. Diese Patienten, welche unter Herzrhythmusstörungen litten, bei welchen durch kardiale Bildgebungsverfahren aber keine Strukturveränderungen gefunden wurden, weisen möglicherweise minimale strukturelle Veränderungen auf, welche zu geringfügig für eine Detektion in der kardialen Bildgebung sind, aber dennoch zu Arrhythmien führen.

Für Kardiomyopathien kausale Genmutationen betreffen oft Strukturgene, welche für Sarkomerproteine wie Troponin, Myosin oder Myosin-assoziierte Proteine codieren. So weist zum Beispiel die DCM die höchste Mutationsfrequenz im wichtigen Strukturgen Titin auf, welches bei 20-25% der Patienten genetisch verändert ist. Es folgen die Gene für Lamin A/C (LMNA, 6%, relevant für die Kernlamina) und das Gen für die schwere Kette des Myosins (MYH7, 4%, relevant für den Muskelaufbau) (15). Im Rahmen dieser Arbeit konnten bei AUCM-Patienten ebenfalls fünf Varianten in diesen drei Genen detektiert werden, wobei sich jeweils zwei potentiell kausale Varianten (Klasse 4 und 5) in LMNA und TTN fanden sowie eine Klasse 5 Variante in MYH7. Während die TTN-Varianten sowie eine LMNA-Variante bisher unbekannt waren, sind die zweite LMNA- und die MYH7-Variante

bereits in vorherigen Publikationen, jedoch nicht im Zusammenhang mit einer DCM beschrieben worden (65, 66-68).

Damit ähnelt die AUCM phänotypisch wie auch genotypisch der DCM und der ARVC/D, welche beide vornehmlich durch Mutationen in Strukturproteinen bedingt sind, aber unterscheidet sich (genetisch) deutlich von der CPVT, bei welcher zu 70% Mutationen im RYR2-Gen bestehen (22).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden nur sieben Genvarianten in Genen identifiziert, welche eine Rolle im Aufbau von Ionenkanälen spielen und durch welche Arrhythmien induziert werden können. Der Anteil der Varianten in Genen, in welchen Veränderungen als kausal für Arrhythmien beschrieben sind, lag bei lediglich 25%. Mutationen in Ionenkanälen scheinen folglich eher weniger relevant für die AUCM zu sein. Unter diesen Genvarianten waren Beispiele bekannt, die mit für das Krankheitsgen untypischen Symptomen assoziiert waren. So zeigte sich im Rahmen dieser Arbeit bei einem Patienten die Variante Arg82Trp in KCNJ2, die bereits in einer vorherigen Publikation detektiert worden war (64, 69). Interessant war, dass, obwohl es sich bei KCNJ2 um ein LQT7-Gen handelt, bei dem in der Publikation untersuchten Patienten und auch bei dem hier untersuchten Patienten kein verlängertes QT-Intervall bestand. Weitere Aspekte hierzu werden in Abschnitt 4.3 diskutiert.

Zusammenfassend ähnelt die AUCM folglich genetisch der ARVC/D und DCM, dennoch grenzt sie sich aber insbesondere phänotypisch entschieden zu diesen ab. Phänotypische Diagnosekriterien der ARVC/D bzw. DCM werden bei den AUCM-Patienten nicht vollständig erfüllt – einzelne Aspekte, wie eine Dilatation, fanden sich zwar in der Bildgebung wieder, jedoch weniger ausgeprägt als es für die Diagnosestellung notwendig gewesen wäre. Zudem zeigte sich meist eine Überlappung phänotypischer Merkmale beider Krankheitsbilder. Ein typischer Fall stellt die Patientin 12644-1 dar, bei welcher mittels Kardio-MRT eine vermehrte Trabekularisierung des rechten Ventrikels detektiert wurde, ohne dass jedoch die Diagnosekriterien der ARVC/D erfüllt waren, und zudem eine leichte Dilatation des linken Ventrikels bestand, welche aber nicht für die Diagnose einer DCM ausreichend war. So scheint es sich bei der AUCM vielmehr um ein spezielles, heterogenes, aber eben eigenständiges Krankheitsbild zu handeln. Weitere Abgrenzungen zu den anderen Kardiomyopathien, sowie die weitere phänotypische Entwicklung von AUCM-Patienten, sind bisher aufgrund der geringen Datenlage schwierig zu konkretisieren, sodass, auch für die weitere Ausarbeitung wichtiger Diagnosekriterien, zusätzliche Studien notwendig sind. Zu untersuchen ist etwa, in wie weit die Dilatation der Ventrikel fortschreitet oder ob es nicht vielmehr durch die Trabekularisierung zum Krankheitsprogress und erhöhten Mortalität kommt. Ideal wären dabei prospektive Beobachtungsstudien, welche durch regelmäßige Bildgebung und klinische Kontrollen den phänotypischen Verlauf der AUCM detailliert nachvollziehen würden.

## **4.3 Zuordnung der arrhythmogenen unklassifizierten Kardiomyopathie**

Zuzuordnen ist die AUCM am ehesten der Gruppe der arrhythmogenen Kardiomyopathien (ACM). Der Begriff der ACM ist zwar relativ neu, wird aber bereits von zahlreichen Fachzeitschriften verwendet, wie dem *Rhythm Journal* und dem *Circulation Research* (3, 22). Seit einiger Zeit wird auch die ARVC/D vermehrt von einigen Autoren als eine Unterform der ACM angesehen (3, 23). So beschreiben Mattesi et al. die ARVC/D als die am besten charakterisierte Variante der arrhythmogenen Kardiomyopathie und weisen darauf hin, dass für eine bessere Diagnosestellung und aufgrund des weiten Spektrums der phänotypischen Ausprägung der ARVC/D seit einiger Zeit der Begriff der arrhythmogenen Kardiomyopathie als Oberbegriff verwendet wird (72).

Zu der Einordnung der AUCM als Unterform der ACM passt die hier aufgestellte These, dass es viele Ähnlichkeiten zwischen der AUCM und der ARVC/D gibt, aber dennoch bestimmte, charakteristische Unterschiede. Auch wird in der Literatur von den deutlichen Überschneidungen der arrhythmogenen Kardiomyopathie zu der DCM sowie deutlich seltener zu der H(O)CM berichtet (3). Passend dazu sind die obenstehenden Ausführungen der Ähnlichkeiten von AUCM und DCM bezüglich des Phänotyps. Insgesamt ist anzunehmen, dass es sich bei der AUCM um ein spezielles, heterogenes aber eben eigenständiges Krankheitsbild handelt, welches als eine Unterform der arrhythmogenen Kardiomyopathie betrachtet werden kann.

## **4.4 Gemeinsamkeiten und Unterschiede in Geno- und Phänotypen**

Einige der in dieser Arbeit identifizierten Genmutationen, die bereits in der Literatur beschrieben wurden, sind auch mit Krankheitsbildern assoziiert, die untypisch für das vorliegende Gen sind. So wurde die hier detektierte Mutation Asp545Asn im MYH7 Gen nicht in Verbindung mit einer DCM, sondern mit einer *non-compaction* Kardiomyopathie beschrieben bei zusätzlichem Vorliegen einer ventrikulären Tachykardie (65). Auch bei der hier detektierten Mutation Arg190Trp im LMNA Gen sind Fallbeispiele bekannt, bei denen aufgrund von dokumentierten Episoden ventrikulärer Tachykardien, bei nur leicht verminderter Pumpleistung, initial die Diagnose einer ARVC/D gestellt worden ist (66-68). Dabei sind Mutationen im LMNA-Gen eigentlich typisch für die DCM (51).



Vergleicht man nun die in den Publikationen beschriebenen Phänotypen mit denen der hier untersuchten Patienten fallen sowohl Gemeinsamkeiten als auch Unterschiede auf.

Das KCNJ2 Gen ist in der Literatur mit dem LQT7-Syndrom assoziiert (51). Die detektierte Mutation Arg82Trp in KCNJ2 war bereits als pathogen beschrieben, wobei sich in dem in der Publikation untersuchten Phänotyp bei einem interessanterweise regelrechten QT-Intervall anstrengungsinduzierte bidirektionale VT fanden. Das heißt, es bestand primär ein arrhythmogener Phänotyp, ohne jedoch die Kriterien eines LQTS zu erfüllen (64). Dieses Untersuchungsergebnis ähnelt dem Phänotyp der in dieser Arbeit untersuchten Patientin, welche bei ebenfalls (grenzwertig) normaler QTc-Zeit ventrikuläre Extrasystolen in Form von Bigemini sowie ventrikuläre Tachykardie aufwies. Beide Patienten wiesen folglich einen für die detektiert Genmutation untypischen kardiomorphologischen Phänotyp auf.

Darüber hinaus fand sich die bereits oben erwähnte Mutation Asp545Asn im MYH7 Gen bei einem hier untersuchten Patienten. Während sich bei dem in der Publikation beschriebenen Patienten eine Sinustachykardie, ein Linksschenkelblock sowie eine *non-compactio* Kardiomyopathie mit schwerer linksventrikulärer Dysfunktion zeigte (64), wies der hier untersuchte Patient ventrikuläre Extrasystolen mehrerer Morphologien, eine ventrikuläre Tachykardie unter Belastung sowie eine auffällige Hypertrabekularisierung der Ventrikel auf, wobei für eine linksventrikuläre *Non-Compaction* Kardiomyopathie (LVNC) kein ausreichender Befund vorlag. Folglich unterschieden sich die beiden untersuchten Patienten leicht in ihren Phänotypen, zeigten aber beide keine Anzeichen der für das Gen eigentlich typischen DCM (51).

Darüber hinaus gibt es aber auch mehrere detektierte Varianten, in denen die detektierte Genmutation und der für solche Genmutationen typische Phänotyp durchaus zueinander passen. So fand sich die Mutation Glu278Lysfs\*11 im DSG2 Gen, welches als typisches Gen der ARVC/D beschrieben ist (51). Bei dem zugehörigen Patienten konnten zwar die Diagnosekriterien für die ARVC/D nicht erfüllt werden, es fanden sich dennoch rechtsventrikuläre Pathologien mit fibrolipomatöser Infiltration des Myokards. Ebenso passend ist der genetische Befund eines Patienten mit den Mutationen Pro815Leu im RYR2 Gen und Gly581Glu im PKP2 Gen: während RYR2-Mutationen typischerweise kausal für eine CPVT sind, verursachen PKP2-Mutationen oftmals eine ARVC/D (51). Der hier untersuchte Patient zeigte dabei Anzeichen beider Erkrankungen, wenn auch die Befunde nicht für eine definitive Diagnosestellung ausreichten. So präsentierte der Patient polymorphe ventrikuläre Extrasystolen, Couplets und Triplets, allerdings sowohl in Ruhe als auch in Belastung, sowie fokale Kontrastmittelanreicherungen im rechten Ventrikel, wie sie für die ARVC typisch sind (51).

Zusammenfassend wurden im Rahmen dieser Arbeit Varianten detektiert, die ebenso wie in Vorarbeiten nicht zu der Erkrankung passten, für die eine solche Mutation eigentlich typisch sind. Daraus schließt sich, dass von einer bestimmten Genmutation anscheinend nicht auf den spezifischen Phänotyp eines Patienten geschlossen werden kann, sondern es wohl zum Teil eine breite Vielfalt an Phänotypen gibt, die durch Mutationen in einem Gen verursacht werden kann.

## 4.5 Die AUCM ist eine Multigenerkrankung

Zu Beginn der Arbeit bestand die Frage, ob es für die arrhythmogene unklassifizierte Kardiomyopathie ein einziges kausales Gen gibt, welches für den kardialen Phänotyp der AUCM-Patienten verantwortlich ist. Da aber der klinische Phänotyp der Patienten hochgradig heterogen ist, erschien dies unwahrscheinlich. So ist das Ergebnis der Genanalysen, dass auch die Genotypen der Patienten äußerst heterogen sind, wenig überraschend. Zwar lassen sich einzelne Hauptgene, wie die desmosomalen Gene, herausstellen, dennoch muss von einem weiten Feld der AUCM-verursachenden Gene ausgegangen werden.

Dieses Ergebnis korreliert mit den Aussagen der *European Society of Cardiology*, welche 2017 beschrieb, dass sich bei der arrhythmogenen Kardiomyopathie die meisten kausalen Genmutationen zwar in den desmosomalen Genen finden lassen, seltener dennoch auch nicht-desmosomale Gene als kausal identifiziert wurden, sodass insgesamt von einer breiten Anzahl an kausalen Genen ausgegangen werden muss (22).

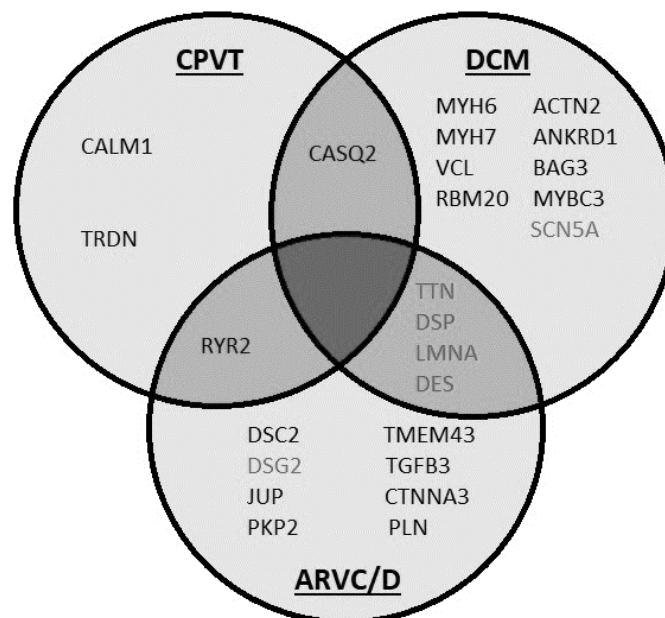
Dies stellt nun allerdings diagnostische Genanalysen vor große Herausforderungen: eine höhere Anzahl an Kandidatengenen geht mit einem erhöhten Arbeitsaufwand und somit auch erhöhten Kosten einher. So sollten zunächst die Hauptgene der AUCM (DSP, LMNA, TTN, DES, SCN5A, DSG2), wie sie im Rahmen dieser Arbeit ermittelt wurden, getestet und erst nachfolgend die selteneren kausalen Gene überprüft werden.

Die genetische Heterogenität der AUCM ist typisch für Kardiomyopathien. Für die dilatative Kardiomyopathie sind über 25 Gene als kausal bekannt, zahlreiche von diesen sind außerdem für eine weitere Herzerkrankung als pathogen klassifiziert (49). Einige der relevantesten Gene für die DCM sind in Tabelle 26 genannt. Bei der CPVT finden sich vor allem Veränderungen in den Genen CALM1, CASQ2, RYR2 und TRDN. Insgesamt kann aber bei 35-45% der CPVT-Patienten keine kausale Genmutation gefunden werden (19). Bei ARVC/D-Patienten finden sich vor allem Mutationen in sechs Genen (DSC2, DSG2, DSP, JUP, PKP2, TMEM43) sowie deutlich weniger häufig in weiteren sieben Genen (54). Als Hauptkrankheitsgene für die AUCM wurden in dieser Arbeit die Gene DSP, LMNA, TTN, DES, SCN5A,

DSG2 identifiziert. Diese sowie auch die Hauptgene anderer Kardiomyopathien kommen zum Teil bei mehreren Krankheitsbildern vor. Die für die Kardiomyopathien als kausal eingestuften Gene und ihre Überlappungen untereinander sind in Tabelle 26 und in Abbildung 59 dargestellt. In Abbildung 59 sind die AUCM-Gene rot markiert.

**Tabelle 26: Kardiomyopathien und ihre Hauptgene sowie Überschneidungen zwischen diesen**

AUCM	DSP, LMNA, TTN, DES, SCN5A, DSG2
DCM	MYH6, MYH7, ACTN2, VCL, ANKRD1, BAG3, RBM20, MYBC3, TTN, DSP, LMNA, DES, CASQ2, SCN5A
CPVT	CALM1, TRDN, CASQ2, RYR2
ARVC	DSC2, DSG2, DSP, JUP, PKP2, TMEM43, TGFB3, CTNNA3, PLN, TTN, LMNA, DES, RYR2
AUCM und DCM	TTN, DSP, LMNA, DES
AUCM und ARVC	TTN, DSP, LMNA, DES, DSG2
DCM und CPVT	CASQ2
CPVT und ARVC	RYR2
AUCM, DCM und ARVC	TTN, DSP, LMNA, DES



**Abbildung 59: Überschneidungen der als kausal eingestuften Gene für Kardiomyopathien**

In Tabelle 26 sowie in Abbildung 59 sind jeweils nur die häufigsten Gene, welche kausal für die Kardiomyopathien sind, aufgeführt (24, 50, 51). Alle oben aufgeführten Gene sind durch das *Cardio Panel* von *Illumina*® abgedeckt.

Unter den Krankheitsgenen für Kardiomyopathien gibt es zahlreiche Beispiele, bei denen verschiedene Mutationen in demselben Gen zwei verschiedene Formen von Kardiomyopathien verursachen. So ist das Gen MYH7 mit 15-20% eines der am häufigsten gefundenen Genmutationen bei der hypertrophen Kardiomyopathie, gleichzeitig finden sich in diesem Gen auch 5% der Mutationen bei der restriktiven Kardiomyopathie (22). Ebenso können Mutationen unterschiedlicher Genloci ein und denselben Phänotyp bedingen. So verursacht eine Mutation im Gen LMNA etwa sechs Prozent der Fälle einer primären DCM, bei 3-4% der DCM-Patienten findet sich hingegen eine kausale Mutation im MYH7-Gen (54). Als Konsequenz gibt es diverse Überschneidungen bei den sog. Kardiomyopathie-Genen, wie in Abbildung 59 dargestellt wurde.

Zusammenfassend konnte auch durch die umfangreichen Analysen im Rahmen dieser Arbeit kein einzelnes, eindeutig-kausales Gen als kausal für die AUCM herausgestellt werden, vielmehr wurde eine ganze Reihe diverser Gene mit potentiell-pathogenen Effekten detektiert. Diese Erkenntnis passt zu anderen aktuellen Wissensständen, dass auch nahezu alle anderen Kardiomyopathien genetisch heterogen verursacht sind (22).

## **4.6 Mithilfe der HRM-PCR lassen sich Probenverwechslungen ausschließen**

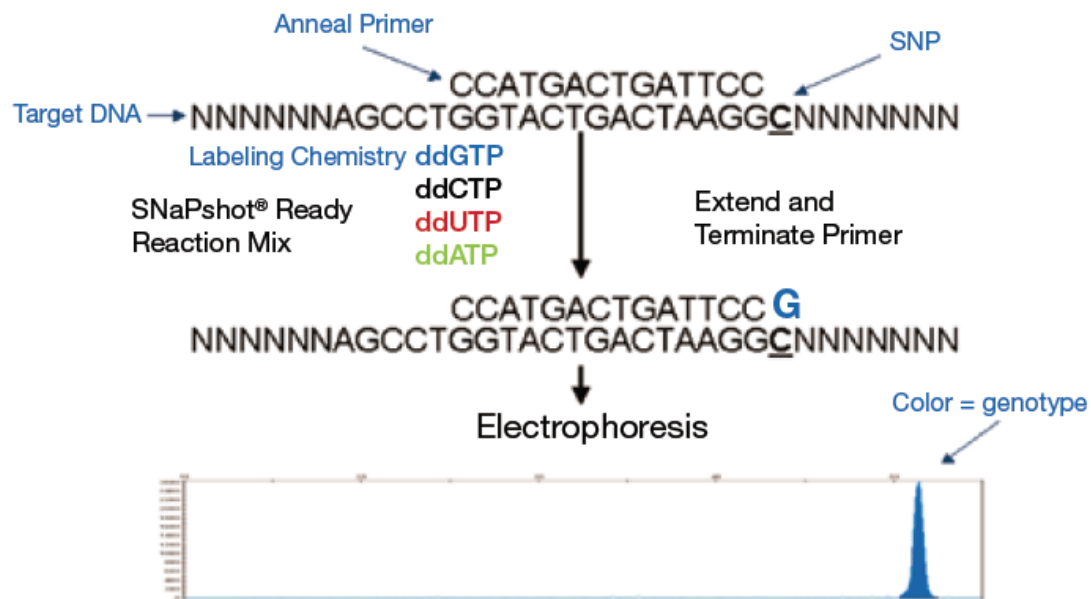
Trotz sorgfältigster Handhabung und genauer Protokollierung kann es im Laufe der recht langen, vielschrittigen *MiSeq<sup>®</sup> library* Präparation zu Probenverwechslungen kommen. Dieses Risiko wird durch Vier-Augen-Prinzipien bei kritischen Schritten zwar minimiert, dennoch muss davon ausgegangen werden, dass es in der Labordiagnostik eine gewisse, wenn auch wahrscheinlich geringe Dunkelziffer an falsch positiven bzw. falsch negativen Befunden aufgrund von Probenvertauschungen gibt. Dies hat natürlich immense Folgen für die Betroffenen: so werden genotypisch betroffene Patienten, die einen falsch-negativen Befund erhalten, nicht adäquat behandelt, während genotypisch gesunde Patienten mit falsch-positivem Befund unnötig Sorgen und Ängste durchstehen und nicht notwendige Therapien erhalten.

So empfiehlt die Deutsche Gesellschaft für Humangenetik (gfh) in ihrer aktuellen S2k-Leitlinie folgendes: „Das Labor muss eine interne Qualitätssicherung durchführen. Die Abläufe im Labor sind so zu organisieren, dass die Möglichkeit einer Probenvertauschung minimiert wird.“ (73). Vorgeschlagen wird dabei das regelmäßige Mitführen von Kontrollproben. In der S1-Leitlinie der gfh zur molekulargenetischen Diagnostik mit Hochdurchsatzverfahren heißt es: „Aspekte der Probenverfolgung sollten während der Validierung mitbetrachtet werden.“ (74).

Auch in der weiteren Literatur wird sich seit einiger Zeit mit diesem Problem beschäftigt (55): so empfiehlt das *European Journal of Human Genetics* in seinen Leitlinien zur diagnostischen Gensequenzierung, dass Proben nachverfolgbar sein sollten (56). Auch das *American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG)* empfiehlt aufgrund der Komplexität des Vorbereitungsprozesses für die NGS die Etablierung einer Methode, um Probenverwechslungen auszuschließen (57). Wie genau das zu erfolgen hat, lassen das *European Journal of Human Genetics* und das *ACMG* allerdings relativ offen. Im besten Fall sollte natürlich eine kostengünstige, wenig zeitaufwendige Methode eingesetzt werden, welche dennoch das erforderliche hohe Maß an Sicherheit bietet.

Eine bereits eingesetzte Methode ist die Sequenzierung von SNPs per Sanger-Methode. Dabei werden die individuellen SNPs eines jeden Patienten zu Beginn und am Ende einer *MiSeq*<sup>®</sup> sequenziert und die Ergebnisse miteinander verglichen. Dies bringt allerdings hohe Kosten durch die teure Methodik sowie viel Aufwand in Form von personeller Arbeit mit sich.

Zum anderen gibt es die Möglichkeit der Genotypisierung mittels *SNapShot*<sup>®</sup> von *Thermo Fisher*<sup>®</sup>. Dabei handelt es sich um eine Primer-basierte Methode zur Analyse von SNPs, wobei ein *single-tube Multiplex* Ansatz von bis zu zehn Proben möglich ist. In jedem Ansatz wird dabei zunächst eine PCR durchgeführt, gefolgt von einer *single-base extension* mit fluoreszierenden Didesoxynukleotiden. Je nachdem welche Variante des SNP vorliegt, wird eine andere Farbe eingebaut. Das entstandene Produkt wird anschließend separiert und mithilfe von Kapillarelektrophorese die Fluoreszenz detektiert (70). In Abbildung 60 ist die Methode vereinfacht dargestellt.



**Abbildung 60:** Methodik des SNaPshot® Genotyping (71)

Der Vorteil des SNaPshot® Genotyping gegenüber dem Sequenzieren von SNPs mittels Sanger ist eindeutig der geringere Kosten- und Arbeitsaufwand. Gleichzeitig ist die parallele Analyse von zahlreichen DNA-Proben möglich. Problematisch bleibt dennoch, dass laut Angaben des Herstellers trotzdem immer noch mindestens sechs Arbeitsschritte (PCR, Elongation mit den ddNTPs, Auftrennung, Kapillarelektrophorese etc.) notwendig sind.

Eine noch effizientere Möglichkeit zur Lösung dieses hochaktuellen Problems wäre die folgende, neu entwickelte Methode: um die Möglichkeit einer Probenverwechslung mit an Sicherheit grenzender Wahrscheinlichkeit auszuschließen, wurde eine Methode zur Überprüfung mithilfe der HRM-PCR etabliert. Mithilfe dieser werden parallel acht jeweils individuelle SNPs überprüft und zwar durch die Methode des Multiplexen mit einem insgesamt sehr geringen Arbeitsaufwand. Dadurch werden zusätzliche Kosten, Zeit und Arbeit minimiert und dennoch eine Qualitätssicherung erreicht.

Zudem zeichnet sich die HRM-PCR durch ihre hohe Sicherheit aus. Durch die Methode können Probenverwechslungen zu über 95 % ausgeschlossen werden. Diese Validität ergibt sich aus der mathematisch berechneten sog. *design-accuracy*, welche durch die Methode selbst festgelegt ist, sowie aus der technischen *accuracy*, welche bei jedem Probenlauf variiert. Die verbleibende Fehlerwahrscheinlichkeit von unter 5% ist gering genug, um akzidentelle Probenvertauschungen während der *library preparation* ab dem ersten Schritt der Probenverarbeitung sicher detektieren zu können. Die Sicherheit der Methode ist somit für die hohen Anforderungen der *library* Präparation als ausreichend zu werten.

Diese hohe Sicherheit geht selbstverständlich nicht ohne Mehrkosten für Materialien und erhöhten Arbeitsaufwand für das Laborpersonal. Pro Probenüberprüfung belaufen sich die Kosten etwa auf einen Euro. Ebenso ist etwa eine halbe Stunde Zeitaufwand für die Präparation von 15 Proben notwendig (zehn Proben aus dem *MiSeq*<sup>®</sup> *run* sowie etwa vier validierte Proben und eine *No-Template-Control*). Schließlich erfordert die Methode einen *Real Time-PCR Cycler*, wobei in dieser Arbeit der *Rotor-Gene Q*<sup>®</sup> von Qiagen genutzt wurde. Dieser wird ohnehin für die Aufbereitung der Proben im Rahmen der *MiSeq*<sup>®</sup> *library* Präparation gebraucht und benötigt für die Analyse von 30 Proben etwa 2 ½ Stunden.

Letztlich verbleibt bei der Methode der HRM-PCR noch als nahezu einzige Fehlerquelle das Einsetzen einer falschen Blutprobe, das heißt einer Probe, welche nicht vom zu untersuchenden Patienten stammt. Diesem Problem ist am ehesten mit konsequenter Beschriftung von Blutröhrchen zu begegnen.

Zusammenfassend ist die zusätzliche Überprüfung zwar mit dem oben erläuterten Mehraufwand verbunden, jedoch kann die Sicherheit der korrekten Probenzuordnung damit vielfach erhöht und somit auf ein ausreichendes Maß gesteigert werden. Zudem ist der zusätzliche Aufwand verschwindend gering im Anbetracht der immens aufwändigen *library* Präparation für die *MiSeq*<sup>®</sup>.

## 5. Fazit und Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit galt es zu untersuchen, ob die arrhythmogene unklassifizierte Kardiomyopathie genetisch bedingt ist und welche Gene an ihrer Entstehung kausal beteiligt sind. Dafür wurden 57 Patienten, bei welchen zuvor durch eine/n Kardiologin/-en die Diagnose der AUCM gestellt wurde, genotypisiert. Mithilfe der durchgeführten Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die AUCM einen großen genetisch bedingten Anteil aufweist. So zeigten 35 von 57 Patienten (=61%) eine potentiell-kausale genetische Veränderung auf. Dabei konnte nicht ein bestimmtes Gen als kausal für die AUCM definiert werden, da sich die detektierten Mutationen vielmehr in einer Vielzahl von Struktur- sowie Arrhythmie-Genen zeigen. Dies verkompliziert letztendlich die Diagnostik bei Patienten mit Verdacht auf AUCM: behandelnde Ärzte müssen somit bei erkrankten Patienten eine Vielzahl von Genen untersuchen lassen und nicht etwa nur ein einziges Gen, was mit deutlich weniger Kosten und Aufwand verbunden wäre. Dennoch ist bei Patienten mit kardio-arrhythmischen Ereignissen, insbesondere nach einem überlebten SCD, eine Multi-Gen-Panel-Sequenzierung (MGPS) eindeutig indiziert.

Darüber hinaus konnte bei 22 Patienten hingegen keine potentiell-kausale Genmutation gefunden werden. Dennoch ist eine genetische Ätiologie auch bei diesen Patienten nicht auszuschließen, da kein *Whole-Genome-Sequencing* stattgefunden hat. Insbesondere bei Patienten, welche eine starke Familienanamnese bezüglich Arrhythmien und plötzlicher Herztode haben, ist die Möglichkeit eines genetischen Hintergrunds, also einer Erbkrankheit, sehr wahrscheinlich. Gerade bei solchen Patienten, bei welchen auch trotz aufwendigen NGS-Untersuchungen, keine kausale Genmutation gefunden wurde, ist die Möglichkeit einer *Whole-Exome-Sequenzierung* zu erwägen. An dieser Stelle wären weitere laborexperimentelle Untersuchungen im Rahmen einer Forschungsarbeit notwendig, um zu erfahren, bei welchem Prozentanteil von Personen mit bisher unaufgeklärtem genetischen Hintergrund eine *Whole-Exom-Sequenzierung* neue Erkenntnis bringt.

Als zweiter Bestandteil dieser Arbeit erfolgte die Etablierung einer Methode um Probenverwechslungen bei genetischen Untersuchungen sicher ausschließen zu können. Um den Patienten eine zweifelsfreie Korrektheit ihrer Untersuchungsergebnisse zu gewährleisten, müssen Probenvertauschungen im Laboralltag ausgeschlossen werden können. Durch die vorgestellte Methode ist dies mit einer Sicherheit von 95,15% garantiert. Darüber hinaus stellt das hier etablierte Verfahren eine einfache, sehr kostengünstige Option mit geringem Zeitaufwand dar, durch welche die Patientensicherheit optimiert werden kann. So ist allen Laboren, welche genetische Diagnostik mithilfe von MGPS durchführen, die zusätzliche Validierung durch die vorgestellte Methode zu empfehlen.



## 6. Literaturverzeichnis

1. Richardson P, McKenna W, Bristow M, Maisch B, Mautner B, O'Connell Jea. Report of the 1995 world health organization/international society and federation of cardiology task force on the definition and classification of cardiomyopathies. *Circulation Research* 1996; 93 (5):S.841–2. doi: 10.1161/01.CIR.93.5.841
2. Rapezzi C, Arbustini E, Caforio A, Charron P, Gimeno-Blanes J, Heliö T et al. Diagnostic work-up in cardiomyopathies: bridging the gap between clinical phenotypes and final diagnosis. A position statement from the ESC Working Group on myocardial and pericardial diseases. *Circulation Research* 2013; 34(19):1448–58. doi: 10.1093/eurheartj/ehs397.
3. Corrado D, Basso C, Judge DP. Arrhythmogenic Cardiomyopathy. *Circulation Research* 2017; 121(7):784–802. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.117.309345.
4. Towbin JA, McKenna WJ, Abrams DJ, Ackerman MJ, Calkins H, Darrieux FCC et al. 2019 HRS expert consensus statement on evaluation, risk stratification, and management of arrhythmogenic cardiomyopathy. *Heart Rhythm* 2019; 16(11):e301-e372. doi: 10.1016/j.hrthm.2019.05.007.
5. Elliott P, Andersson B, Arbustini E, Bilinska Z, Cecchi F, Charron P et al. Classification of the cardiomyopathies: a position statement from the european society of cardiology working group on myocardial and pericardial diseases. *European Heart Journal* 2007; 29(2):270–6. doi: 10.1093/eurheartj/ehm342.
6. Maron JB, Towbin JA, Thiene G, Antzelevitch C, Corrado D, Arnett D et al. Contemporary definitions and classification of the cardiomyopathies. *Circulation Research* 2006; 113(14):1807–16. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.106.174287.
7. Stallmeyer B, Dittmann S, Schulze-Bahr E. Genetische Diagnostik zur Vermeidung des plötzlichen Herztods. *Internist* 2018; 59(8):776–89. doi: 10.1007/s00108-018-0462-x.
8. Winkel BG, Holst AG, Theilade J, Kristensen IB, Thomsen JL, Ottesen GL et al. Nationwide study of sudden cardiac death in persons aged 1–35 years. *European Heart Journal* 2011; 32(8):983–90. doi: 10.1093/eurheartj/ehq428.
9. Sweet ME, Taylor MRG, Mestroni L. Diagnosis, prevalence, and screening of familial dilated cardiomyopathy. *Expert Opinion on Orphan Drugs* 2015; 3(8):869–76. doi: 10.1517/21678707.2015.1057498.
10. Mozaffarian D, Benjamin EJ, Go AS, Arnett DK, Blaha MJ, Cushman M et al. Heart disease and stroke statistics—2015 update. *Circulation Research* 2015; 131(4):1. doi: 10.1161/CIR.0000000000000152.
11. Spezzacatene A, Sinagra G, Merlo M, Barbati G, Graw SL, Brun F et al. Arrhythmogenic phenotype in dilated cardiomyopathy: natural history and predictors of life-threatening arrhythmias. *Journal of the American Heart Association* 2015; 4(10). doi: 10.1161/JAHA.115.002149.
12. Taylor MRG, Carniel E, Mestroni L. Cardiomyopathy, familial dilated. *Orphanet Journal of Rare Diseases* 2006; 1(1):27. doi: 10.1186/1750-1172-1-27.
13. Mestroni L. Guidelines for the study of familial dilated cardiomyopathies. *European Heart Journal* 1999; 20(2):93–102. doi: 10.1053/euhj.1998.1145.
14. McNally EM, Golbus JR, Puckelwartz MJ. Genetic mutations and mechanisms in dilated cardiomyopathy. *Journal of Clinical Investigation* 2013; 123(1):19–26. doi: 10.1172/JCI62862.
15. Pinto YM, Elliott PM, Arbustini E, Adler Y, Anastasakis A, Böhm M et al. Proposal for a revised definition of dilated cardiomyopathy, hypokinetic non-dilated cardiomyopathy, and its implications for clinical practice: a position

- statement of the ESC working group on myocardial and pericardial diseases. *European Heart Journal* 2016; 37(23):1850–8. doi: 10.1093/eurheartj/ehv727.
16. Nof E. Are all cpvt patients equal?? *The Israel Medical Association journal* 2015; IMAJ17((9)):576–7.
  17. Pölönen RP, Penttinen K, Swan H, Aalto-Setälä K. Antiarrhythmic effects of carvedilol and flecainide in cardiomyocytes derived from catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia patients. *Stem Cells International* 2018; 2018(2):1–11. doi: 10.1155/2018/9109503.
  18. Sumitomo N. Current topics in catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. *Journal of Arrhythmia* 2016; 32(5):344–51. doi: 10.1016/j.joa.2015.09.008.
  19. Napolitano C, Bloise R, Memmi M, Priori SG. Clinical utility gene card for: Catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia (CPVT). *European Journal of Human Genetics* 2014; 22(1):152. doi: 10.1038/ejhg.2013.55.
  20. Patel H, Shah P, Rampal U, Shamoan F, Tiyyagura S. Arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy (ARVD/C) and catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia (CPVT): A phenotypic spectrum seen in same patient. *Journal of Electrocardiology* 2015; 48(5):874–8. doi: 10.1016/j.jelectrocard.2015.06.005.
  21. Karmouch J, Protonotarios A, Syrris P. Genetic basis of arrhythmogenic cardiomyopathy. *Current Opinion in Cardiology* 2018;1. doi: 10.1097/HCO.0000000000000509.
  22. Hoorntje ET, te Rijdt WP, James CA, Pilichou K, Basso C, Judge DP et al. Arrhythmogenic cardiomyopathy: pathology, genetics, and concepts in pathogenesis. *Cardiovascular Research* 2017; 113(12):1521–31. doi: 10.1093/cvr/cvx150.
  23. Akdis D, Brunckhorst C, Duru F, Saguner AM. Arrhythmogenic cardiomyopathy: electrical and structural phenotypes. *Arrhythmia & Electrophysiology Review* 2016; 5(2):90. doi: 10.15420/AER.2016.4.3.
  24. Marcus FI, McKenna WJ, Sherrill D, Basso C, Bauce B, Bluemke DA et al. Diagnosis of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy/dysplasia. *Circulation Research* 2010; 121(13):1533–41. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.108.840827.
  25. Waschke J. The desmosome and pemphigus. *Histochemistry and Cell Biology* 2008; 130(1):21–54. doi: 10.1007/s00418-008-0420-0.
  26. Asimaki A, Kleber AG, Saffitz JE. Pathogenesis of arrhythmogenic cardiomyopathy. *Canadian Journal of Cardiology* 2015; 31(11):1313–24. doi: 10.1016/j.cjca.2015.04.012.
  27. Voelkerding KV, Dames SA, Durtschi JD. Next-generation sequencing: from basic research to diagnostics. *Clinical Chemistry* 2009; 55(4):641–58. doi: 10.1373/clinchem.2008.112789.
  28. Grada A, Weinbrecht K. Next-Generation sequencing: methodology and application. *Journal of Investigative Dermatology* 2013; 133(8):1–4. doi: 10.1038/jid.2013.248.
  29. Illumina Inc. (2011). Quality scores for next-generation sequencing.: Assessing sequencing accuracy using Phred quality scoring. In: Technical Note: Sequencing. Verfügbar unter: [https://www.illumina.com/documents/products/technotes/technote\\_Q-Scores.pdf](https://www.illumina.com/documents/products/technotes/technote_Q-Scores.pdf). Heruntergeladen am 29.10.2020.
  30. Quail M, Smith ME, Coupland P, Otto TD, Harris SR, Connor TR et al. A tale of three next generation sequencing platforms: comparison of Ion torrent, pacific biosciences and illumina MiSeq sequencers. *BMC Genomics* 2012; 13(1):341. doi: 10.1186/1471-2164-13-341.

31. Qiagen GmbH Germany (2018). Principle of HRM Technology. Verfügbar unter: <https://www.qiagen.com/mx/resources/technologies/hrm/principle%20of%20hrm%20technology/>. Heruntergeladen am 29.10.2020.
32. Klenow H, Henningsen I. Selective elimination of the exonuclease activity of the deoxyribonucleic acid polymerase from *Escherichia coli* B by limited proteolysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1970; 65(1):168–75. doi: 10.1073/pnas.65.1.168.
33. Illumina Inc (2017). An introduction to Next-Generation Sequencing Technology. Verfügbar unter: [https://emea.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/products/illumina\\_sequencing\\_introduction.pdf](https://emea.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/products/illumina_sequencing_introduction.pdf). Heruntergeladen am 29.10.2020.
34. Illumina Inc, Hrsg (2013). MiSeq System User Guide 2013. San Diego, California, USA.
35. Agilent Technologies, Hrsg. Agilent 2100 BioAnalyzer System. 2100 Software User Guide. Santa Clara, California, USA 2018.
36. Mülhardt C (2009). Das Werkzeug. In: Mülhardt C (Hrsg.) *Der Experimentator: Molekularbiologie/ Genomics.*, 7. Auflage, Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag, Deutschland, S.47-83.
37. Mülhardt C (2009). Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR). In: Mülhardt C (Hrsg.) *Der Experimentator: Molekularbiologie/ Genomics.*, 7. Auflage, Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag, Deutschland, S.84-120.
38. Stallmeyer B, Schulze-Bahr E. Cardiovascular disease and sudden cardiac death: between genetics and genomics. *Eur Heart J* 2015; 36(26):1643–5. doi: 10.1093/eurheartj/ehv173.
39. Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genetics in Medicine* 2015; 17(5):405–23. doi: 10.1038/gim.2015.30.
40. Grantham R. Amino acid difference formula to help explain protein evolution. *Science* 1974; 185(4154):862–4. doi: 10.1126/science.185.4154.862.
41. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1977; 74(12):5463–7. doi: 10.1073/pnas.74.12.5463.
42. Mülhardt C (2009). DNA-Analyse. In: Mülhardt C (Hrsg.) *Der Experimentator: Molekularbiologie/ Genomics.*, 7. Auflage, Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag, Deutschland, S.192-221.
43. Tamburro M, Ripabelli G. High Resolution Melting as a rapid, reliable, accurate and cost-effective emerging tool for genotyping pathogenic bacteria and enhancing molecular epidemiological surveillance: a comprehensive review of the literature. *Annali di igiene : medicina preventiva e di comunita* 2017; 29(4):293–316. doi: 10.7416/ai.2017.2153.
44. Turner A, Sasse J, Varadi A. Rapid detection of pathological mutations and deletions of the haemoglobin beta gene (HBB) by High Resolution Melting (HRM) analysis and Gene Ratio Analysis Copy Enumeration PCR (GRACE-PCR). *BMC Medical Genetics* 2016; 17(1):480. doi: 10.1186/s12881-016-0334-y.
45. Qiagen GmbH Germany, Hrsg (2017). *Type-it HRM PCR Handbook.: For detection of gene mutations and SNPs by high-resolution melting (HRM) analysis.* Hilden, Deutschland.
46. Stenson PD, Ball EV, Mort M, Phillips AD, Shiel JA, Thomas NST et al. Human Gene Mutation Database (HGMD): 2003 update. *Human Mutation* 2003; 21(6):577–81. doi: 10.1002/humu.10212.

47. Andersen ED, Krasilnikoff PA, Overvad H. Intermittent muscular weakness, extrasystoles, and multiple developmental anomalies. *Acta Paediatrica* 1971; 60(5):559–64. doi: 10.1111/j.1651-2227.1971.tb06990.x.
48. Veerapandiyan A, Statland JM, Tawil R. Andersen-Tawil Syndrome. 2004 Nov 22 [Updated 2018 Jun 7]. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, et al., editors. *GeneReviews*®. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2020.
49. O'Leary NA, Wright MW, Brister JR, Ciufu S, Haddad D, McVeigh R et al. Reference sequence (RefSeq) database at NCBI: current status, taxonomic expansion, and functional annotation. *Nucleic Acids Research* 2016; 44(D1):D733-D745. doi: 10.1093/nar/gkv1189.
50. Herman DS, Lam L, Taylor MRG, Wang L, Teekakirikul P, Christodoulou D et al. Truncations of titin causing dilated cardiomyopathy. *N Engl J Med* 2012; 366(7):619–28. doi: 10.1056/NEJMoa1110186.
51. Ackerman MJ, Priori SG, Willems S, Berul C, Brugada R, Calkins H et al. HRS/EHRA expert consensus statement on the state of genetic testing for the channelopathies and cardiomyopathies: This document was developed as a partnership between the Heart Rhythm Society (HRS) and the European Heart Rhythm Association (EHRA). *Europace* 2011; 13(8):1077–109. doi: 10.1093/europace/eur245.
52. Makita N, Behr E, Shimizu W, Horie M, Sunami A, Crotti L et al. The E1784K mutation in SCN5A is associated with mixed clinical phenotype of type 3 long QT syndrome. *Journal of Clinical Investigation* 2008; 23:20. doi: 10.1172/JCI34057.
53. Sylvius N. In vivo and in vitro examination of the functional significances of novel lamin gene mutations in heart failure patients. *Journal of Medical Genetics* 2005; 42(8):639–47. doi: 10.1136/jmg.2004.023283.
54. McNally E, MacLeod H, Dellefave-Castillo L (1993). *GeneReviews*®: Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy. Seattle (WA).
55. Fujiki R, Ikeda M, Ohara O. Short dna probes developed for sample tracking and quality assurance in gene panel testing. *The Journal of Molecular Diagnostics* 2019; 21(6):1079–94. doi: 10.1016/j.jmoldx.2019.07.003.
56. Matthijs G, Souche E, Alders M, Corveleyn A, Eck S, Feenstra I et al. Guidelines for diagnostic next-generation sequencing. *Eur J Hum Genet* 2016; 24(1):2–5. doi: 10.1038/ejhg.2015.226.
57. Rehm HL, Bale SJ, Bayrak-Toydemir P, Berg JS, Brown KK, Deignan JL et al. ACMG clinical laboratory standards for next-generation sequencing. *Genetics in Medicine* 2013; 15(9):733–47. doi: 10.1038/gim.2013.92.
58. Sen-Chowdhry S, Syrris P, Ward D, Asimaki A, Sevdalis E, McKenna WJ. Clinical and genetic characterization of families with arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy provides novel insights into patterns of disease expression. *Circulation Research* 2007; 115(13):1710–20. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.106.660241.
59. Pilichou K, Nava A, Basso C, Beffagna G, Bauce B, Lorenzon et al. Mutations in desmoglein-2 gene are associated with arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Circulation Research* 2006; 113(9):1171–9. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.105.583674
60. Corrado D, Thiene G. Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy/Dysplasia. *Circulation Research* 2006; 113(13):1634–7. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.105.616490.
61. Sen-Chowdhry S, Syrris P, McKenna WJ. Role of genetic analysis in the management of patients with arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy. *Journal of the American College of Cardiology* 2007; 50(19):1813–21. doi: 10.1016/j.jacc.2007.08.008.

62. van Tintelen JP, Entius MM, Bhuiyan ZA, Jongbloed R, Wiesfeld ACP, Wilde AAM et al. Plakophilin-2 mutations are the major determinant of familial arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy. *Circulation Research* 2006; 113(13):1650–8. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.105.609719.
63. Ceyhan-Birsoy O, Pugh TJ, Bowser MJ, Hynes E, Frisella AL, Mahanta LM et al. Next generation sequencing-based copy number analysis reveals low prevalence of deletions and duplications in 46 genes associated with genetic cardiomyopathies. *Molecular Genetics and Genomic Medicine* 2016; 4(2):143–51. doi: 10.1002/mgg3.187.
64. Tester DJ, Arya P, Will M, Haglund CM, Farley AL, Makielski JC et al. Genotypic heterogeneity and phenotypic mimicry among unrelated patients referred for catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia genetic testing. *Heart Rhythm* 2006; 3(7):800–5. doi: 10.1016/j.hrthm.2006.03.025.
65. Hoedemaekers YM, Caliskan K, Majoor-Krakauer D, van de Laar I, Michels M, Witsenburg M et al. Cardiac -myosin heavy chain defects in two families with non-compaction cardiomyopathy: linking non-compaction to hypertrophic, restrictive, and dilated cardiomyopathies. *European Heart Journal* 2007; 28(22):2732–7. doi: 10.1093/eurheartj/ehm429.
66. Arbustini E, Pilotto A, Repetto A, Grasso M, Negri A, Diegoli M, Campana C et al. Autosomal dominant dilated cardiomyopathy with atrioventricular block: a lamin A/C defect-related disease. *Journal of the American College of Cardiology* 2002; 39(6):981–90. doi: 10.1016/s0735-1097(02)01724-2.
67. Quarta G, Syrris P, Ashworth M, Jenkins S, Zuborne Alapi K, Morgan J et al. Mutations in the Lamin A/C gene mimic arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *European Heart Journal* 2012; 33(9):1128–36. doi: 10.1093/eurheartj/ehr451.
68. Bhattacharjee P, Banerjee A, Banerjee A, Dasgupta D, Sengupta K. Structural alterations of lamin a protein in dilated cardiomyopathy. *Biochemistry* 2013; 52(24):4229–41. doi: 10.1021/bi400337t.
69. Lieve KV, Williams L, Daly A, Richard G, Bale S, Macaya D et al. Results of genetic testing in 855 consecutive unrelated patients referred for Long QT Syndrome in a clinical laboratory. *Genetic Testing and Molecular Biomarkers* 2013; 17(7):553–61. doi: 10.1089/gtmb.2012.0118.
70. Fanis P, Kousiappa I, Phylactides M, Kleanthous M. Genotyping of BCL11A and HBS1L-MYB SNPs associated with fetal haemoglobin levels: a SNaPshot minisequencing approach. *BMC Genomics* 2014; 15(1):108. doi: 10.1186/1471-2164-15-108.
71. ThermoFisher Scientific (2020). SNP Genotyping by Fragment Analysis. In: SNP Genotyping & Variant Detection by Sequencing (ThermoFisher Scientific). Verfügbar unter: <https://www.thermofisher.com/de/de/home/life-science/sequencing/dna-sequencing/snp-genotyping-variant-detection-sequencing/snp-genotyping-fragment-analysis.html>. Heruntergeladen am 29.10.2020.
72. Mattesi G, Zorzi A, Corrado D, Cipriani A. Natural History of Arrhythmogenic Cardiomyopathy. *JCM* 2020; 9(3):878. doi: 10.3390/jcm9030878.
73. S2k-Leitlinie Humangenetische Diagnostik und Genetische Beratung. *medgen* 2018; 30(4):469–522. doi: 10.1007/s11825-018-0223-1.
74. S1 Leitlinie: Molekulargenetische Diagnostik mit Hochdurchsatz-Verfahren der Keimbahn, beispielsweise mit Next-Generation Sequencing. *medgen* 2018; 30(2):278–92. doi: 10.1007/s11825-018-0189-z.



# Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich recht herzlich bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Eric Schulze-Bahr für die Überlassung dieses spannenden Dissertationsthemas und die Unterstützung in dieser Zeit bedanken. Ich habe mich in seinem Institut schnell und zu jeder Zeit sehr wohl gefühlt.

Bei Frau Dr. rer. nat. Birgit Stallmeyer bedanke ich mich für die herausragende Betreuung und Begleitung dieser Arbeit mitsamt der Beantwortung unzähliger Fragen, die Einarbeitung in die praktischen Labortätigkeiten sowie die zahlreichen Korrekturen meiner Arbeit. Ihre Unterstützung war mir stets eine enorme Hilfe.

Für die Unterstützung bei der statistischen Auswertung meiner Daten bedanke ich mich bei Frau Kiana Kreitz aus dem Institut für Biometrie und Klinische Forschung des UKM.

Ein großes Dankeschön gilt ebenfalls dem gesamten Team des IfGH. Die Hilfsbereitschaft, Unterstützung und Stimmung unter den Kollegen während meiner Zeit haben sehr zu meiner Motivation sowie dem Erfolg bei der Erstellung der Dissertation beigetragen.

Des Weiteren möchte ich mich bei der Deutsche Herzstiftung für den Erhalt des Kaltenbach-Stipendium bedanken, welches eine große Ehre für mich darstellte.

Mein Dank gilt außerdem meinem Freund Marc Bröskamp, der sich im herausragenden Maße um die mathematischen Belange dieser Arbeit gekümmert hat sowie mich stets unterstützte und nach Rückschlägen motivierte.

Zu guter Letzt möchte ich meinen Eltern danken. Eure moralische Unterstützung, Motivation und euer Rückhalt während meines Studiums sowie meiner Promotion haben mich immer wieder angetrieben und dafür gesorgt, das Ziel niemals aus den Augen zu verlieren. Ebenso danke ich meiner Schwester Viktoria für das Korrektur lesen dieser Arbeit.

# A. Anhang

## Anamnese der Patienten

Alle Patienten zeigen eine kardiale Symptomatik, teils mit einem arrhythmogenen, teils mit einem kardiomyopathischen Schwerpunkt. Bei allen vierzehn vorgestellten, eigens analysierten Patienten konnte eine ventrikuläre Extrasystolie nachgewiesen werden. Acht von Ihnen wiesen eine positive Familienanamnese für den plötzlichen Herztod auf, drei von Ihnen hatten zudem mind. einmal einen funktionellen Herzstillstand durch Kammerflimmern erlitten. Vier der vorgestellten Patienten sind mittlerweile mit einem ICD versorgt. Bei sechs Patienten konnten deutliche strukturelle Veränderungen nachgewiesen werden, wobei diese bei keinem der Patienten ausreichend für eine eindeutige Diagnosestellung, wie beispielsweise der ARVC/D, waren.

**Tabelle 27: Klinische Phänotypen der eigenständig sequenzierten Patienten**

Patienten - ID <sup>21</sup>	Symptome, Krankengeschichte	Detektierte Genmutation
<b>11129-3</b>	Z.n. Reanimation nach Kammerflimmern (7.3.10), anschließende ICD Implantation, DD: CPVT, da unter Katecholamin-Therapie deutliche Zunahme von VES. Bei Belastungs-EKG VES bis hin zu Bigeminus, Couplets und Triplets.	KCNJ2
<b>12083-1</b>	DD: CPVT, polymorphe VES unter Belastung, auch unter $\beta$ -Blocker Therapie, rez. Synkopen unter Stress. ICD-Implantation, welcher seitdem mehrfach Schocks bei Extrasystolie getriggerten Kammerflimmern abgegeben hat. Positive Familienanamnese.	SCN5A
<b>12254-1</b>	Schwindel und Synkopen bei rez. symptomatischen VT (Salven, VES), mit LifeVest versorgt. Im LZ-EKG z.T. ektope P-Wellen, viele SVES und VES, mehrfache Couplets und Triplets sowie Salven.	-
<b>12343-1</b>	VES mit mind. 3 Morphologien, symptomatische nicht anhaltende VT unter Belastung, Z.n. Präsynkope, Ventrikel grenzwertig groß mit normaler EF, auffällige Hypertrabekularisierung im LV.	MYH7
<b>12336-1</b>	verminderte LV-Pumpfunktion ohne Hypertrophie, ARVC oder Dilatation; familiäre SCD-Belastung; im LZ-EKG Breitkomplex-Salven und polymorphe VES, aktuell LifeVest-Versorgung.	TTN ( <i>frame-shift Mutation</i> )

<sup>21</sup> Die Patienten-ID dient der Pseudonymisierung der Patientenproben während der Laborarbeiten, während dem Sekretariat des IfGH eine Zuordnung der Proben erhalten bleibt.



<b>12260-1</b>	V.a. malignen Mitralklappenprolaps, monomorphe VES in Ruhe, pleomorphe VES unter Belastung, positive Familienanamnese für SCD, ICD-Implantation 2016.	LAMA4
<b>12124-1</b>	Dreimalige Synkope (2015), im LZ-EKG häufige VES, zudem Sinus-Arrest, daher ICD-Implantation. Cardio-MRT mit KM Anreicherung subepikardial. Massive familiäre Häufung plötzlicher Todesfälle.	-
<b>12644-1</b>	Ausgeprägte VES & Salven, Synkope; ICD-Implantation, da VES medikamentös nicht persistierten.	-
<b>10915-3</b>	DD: ARVD. Ausgeprägte RV-Dilatation mit reduzierter EF, im MRT typische ARVD-Veränderungen. VES, einmalige Synkope. Bei Biopsie kein sicherer ARVD-Nachweis, aber fibrolipomatöse Infiltration des Myokards.	DSG2
<b>12421-1</b>	Arrhythmogener Phänotyp mit polymorphen VES, Couplets und Triplets (in Ruhe und Belastung), Herzrhythmusstörungen in Form von Herzstolpern und Paroxysmen von Herzrasen. Familiäre Belastung.	PKP2 + RYR2
<b>12215-1</b>	VES, SCD in der Familie (Vater und Sohn). Symptomatische Arrhythmien weniger Minuten. Im LZ-EKG asymptotische monomorphe VES mit LSB-Morphologie.	-
<b>12314-1</b>	Beginnende LV-Dilatation, Kardio-MRT mit initial leichtgradig eingeschränkter LVEF (~50%). Monomorphe VES in Ruhe + Belastung. Herzrhythmusstörungen in Form von Palpationen, hierunter einmalige Präsynkope. Hochpositive Familienanamnese für DCM (u.a. Mutter, Großmutter mütterlicherseits, Bruder, Tante mütterlicherseits)	LMNA
<b>1616-1</b>	Z.n. überlebten SCD bei Kammerflimmern. Dilatative CM mit mittelgradig reduzierter LVEF (45%) und apikal betonter Hypertrabekularisierung. ICD-Implantation. Anamnestisch Präsynkopen und Palpationen. Positive Familienanamnese für SCD und Arrhythmien.	TTN (frame-shift Mutation)
<b>12332-1</b>	asymptotische Sinusbradykardie, symptomatische VES mit unterschiedlichen Morphologien in Ruhe.	-

### ACMG-Kriterien

Das *American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG)* publizierte 2015 diverse Kriterien, anhand welcher eine wissenschaftliche fundierte, nachvollziehbare Einordnung detektierter Varianten in eine der fünf Klassen erfolgen sollte. Dazu wurden zwei Gruppen von Kriterien definiert: eine für die Klassifizierung einer Variante als *pathogen* oder *wahrscheinlich pathogen*, die zweite für die Klassifizierung für *benigne* oder *wahrscheinlich benigne* Varianten. Jedes Kriterium für die potentiell pathogenen Varianten wurde als *very strong* (PVS1), *strong* (PS1-4), *moderate* (PM1-6) oder *supporting* (PP1-5) gewichtet. Darüber hinaus wurden die benignen Kriterien als *stand alone* (BA1), *strong* (BS1-

4) oder *supporting* (BP1-6) gewichtet. Der auswertende Wissenschaftler soll diese Kriterien für die detektierte Variante anhand ihrer Evidenz der Reihe nach prüfen und so die zugehörige Klasse ermitteln. Erfüllt eine Variante keine der Kriterien der beiden Gruppen oder erreicht in beiden Gruppen dieselbe Anzahl zutreffender Kriterien, so ist die Variante als *variant of uncertain significance* zu werten (44). In der untenstehenden Tabelle 28 sind die Kriterien zur Einordnung potentiell pathogener Varianten als pathogen (Kl. 5) oder wahrscheinlich pathogen (Kl. 4) nachzulesen.

**Tabelle 28: Kriterien zur Klassifizierung einer potentiell-kausalen Varianten**

Evidenz der Pathogenität	Kategorie	Kriterium
<i>Very strong</i>	PVS1	Nullvariante ( <i>nonsense, frameshift, Startcodon, Single / Multiexon Deletion, Änderung der SpliceSite</i> ) in einem Gen, in welchem ein Funktionsverlust ein bekannter Pathomechanismus ist
<i>Strong</i>	PS1	Derselbe Aminosäureaustausch wie bei einer bereits bekannten pathogenen Variante, unabhängig von dem Basenaustausch. Bsp.: Val→Leu kann durch G>C oder G>T verursacht werden
	PS2	De novo, d.h. neu auftretende Mutation bei einem betroffenen Patienten mit negativer Familienanamnese (Voraussetzung: sichere Vater- und Mutterschaft)
	PS3	Gut etablierte Studien über den funktionellen in vitro- oder in vivo-Effekt der Variante, welche den schädigen Effekt belegen
	PS4	Die Prävalenz der Variante ist bei betroffenen Individuen signifikant erhöht gegenüber der Prävalenz in Kontrollpopulationen
<i>Moderate</i>	PM1	Die Veränderung ist lokalisiert in einem <i>Mutationshotspot</i> und/oder einer empfindlichen, gut erforschten Proteindomäne (bspw. dem aktiven Zentrum eines Enzyms)
	PM2	Unbekannt (oder sehr selten) in Kontrollen (Vergleich mit ExAC u.a.)
	PM3	Bei rezessiven Varianten: Vorliegen einer Compound-Heterozygotie, d.h. Vorliegen zweier Mutationen in-trans
	PM4	Die Proteinlänge ändert sich (aufgrund von in-frame Deletionen/Insertionen in einer nicht-repetitiven Sequenz oder durch Stoppcodon-Verlust)
	PM5	Änderung der Aminosäure an einer Stelle, wo der Austausch zu einer anderen Aminosäure bereits als pathogen beschrieben wurde. Bspw. kommt es durch die Mutation zu einem A->B Austausch und der A->C Austausch ist bereits als pathogen beschrieben
	PM6	De novo Mutation bei nicht-sicherer Mutter- oder Vaterschaft
<i>Supporting</i>	PP1	Kosegregation mit der Erkrankung bei mehreren betroffenen (d.h. positiv getesteten) Familienmitgliedern in einem als kausal für die Erkrankung beschriebenen Gen
	PP2	Missense Variante in einem Gen mit geringer Rate an benignen Missense Varianten (quantifizierbar mithilfe des Z-Score; dieser sollte über 1 liegen)
	PP3	Mehrere Hinweise auf schädigenden Effekt durch Einschätzungen der Pathogenitätsvorhersageprogramme
	PP4	Phänotyp / Familienhistorie des Patienten ist hochspezifisch für eine monogenetische Erkrankung
	PP5	Seriöser Bericht über pathogenen Effekt der Variante, wobei die Evidenzgrundlage für das eigene Labor nicht erreichbar und somit nachvollziehbar ist, um eine unabhängige Evaluation vorzunehmen

Darüber hinaus konnten potentiell benigne Varianten als solche bestätigt werden. Dazu musste die in Tabelle 29 aufgeführten zwölf Kriterien geprüft werden. Die Kriterien entstammen der Veröffentlichung des ACMG und sind ebenfalls leicht gekürzt sowie ins Deutsche übersetzt worden.

**Tabelle 29: Kriterien zur Einordnung einer potentiell benignen Variante als benigne oder wahrscheinlich benigne**

Evidenz der potentiell benignen Variante	Kategorie	Kriterium
<i>Stand-alone</i>	BA1	Allelfrequenz von mehr als 5% in Vergleichspopulationen
<i>Strong</i>	BS1	Höhere Allelfrequenz als für die Erkrankung zu erwarten wäre
	BS2	Bei gesunden Individuen ebenfalls detektiert, entweder heterozygot bei dominantem Erbgang oder homozygot bei rezessiven (bei Erkrankungen mit vollständiger, früh-einsetzender Penetranz).
	BS3	Gut etablierte Studien zeigen keinen in vitro / in vivo schädigenden Effekt auf die Proteinfunktion oder das Splicen
	BS4	Fehlen einer Segregation bei betroffenen Familienmitgliedern
<i>Supporting</i>	BP1	Missense Variante in einem Gen, bei welchem vor allem verkürzende Mutationen als krankheitskausal beschrieben sind.
	BP2	Beobachtet in <i>trans</i> mit einer pathogenen Variante mit einer voll penetranten dominanten Erkrankung oder beobachtet in <i>cis</i> mit einer pathogenen Variante in jeglichen Vererbungsmuster
	BP3	In-frame Deletion / Insertion in einer repetitiven Region ohne eine bekannte Funktion
	BP4	Mehrere Hinweise auf benignen Effekt der Variante durch Pathogenitätsvorhersageprogramme.
	BP5	Die Variante wurde ebenfalls in einem Fall detektiert, wo die Erkrankung auf alternativer molekularer Basis erklärt werden konnte.
	BP6	Zuverlässige Quellen bezeichnen die detektierte Variante als benigne, ohne dass die zugrundeliegende Evidenz für das Labor erreichbar wäre und somit keine unabhängige Evaluation erfolgen kann.
	BP7	Vorliegen einer stillen Variante bei einem nicht-hochkonservierten Nucleotid, bei welcher weder splicing-Vorhersagealgorithmen Auswirkungen auf die splice-site vorhersagen noch eine neue Splice-Site entsteht.

Anschließend wird die Variante anhand der erfüllten Kriterien klassifiziert, je nachdem als pathogen oder wahrscheinlich pathogen bzw. als benigne oder wahrscheinlich benigne. Dies geschieht anhand der in Tabelle 30 dargestellten Anforderungen.

**Tabelle 30: Klassifizierungskriterien für die Einordnung von detektierten Varianten**

Klassifizierung	Anforderung
<i>Pathogen</i>	i) 1 Very Strong <u>und</u> a) $\geq 1$ Strong <u>oder</u> b) $\geq 2$ Moderate <u>oder</u> c) 1 Moderate und 1 Supporting <u>oder</u> d) $\geq 2$ Supporting ii) $\geq 2$ Strong iii) 1 Strong <u>und</u> a) $\geq 3$ Moderate <u>oder</u> b) 2 Moderate und $\geq 2$ Supporting <u>oder</u> c) 1 Moderate und $\geq 4$ Supporting
<i>Wahrscheinlich pathogen</i>	i) 1 Very Strong und 1 Moderate oder ii) 1 Strong und 1-2 Moderate oder iii) 1 Strong und $\geq 2$ Supporting oder iv) $\geq 3$ Moderate oder v) 2 Moderate und $\geq 2$ Supporting oder vi) 1 Moderate und $\geq 4$ Supporting
<i>benigne</i>	i) 1 Stand-alone oder ii) $\geq 2$ Strong
<i>wahrscheinlich benigne</i>	i) 1 Strong und 1 Supporting oder ii) $\geq 2$ Supporting
<i>Uncertain significance</i>	i) Oben aufgeführten Kriterien sind nichtzutreffend oder ii) Die Kriterien für benigne und pathogen wiegen gleich auf

## Verwendete Primer

**Tabelle 31: Verwendete Primer der Marke eurofins Genomics**

Sequenz 5'-3'	Name	Amplikonlänge	T <sub>M</sub> Primer (NCBI) in °C	T <sub>M</sub> Amplikon
ATGTCTAAGCCAGACCTCACTG	DES+ rs1058261	92 bp	59.5	87°C
CACTCCTCAGCTTCAGAAATGTTC	DES- rs1058261		59.85	
CTTCAAGGGCTGGTTCCTCAT	KCNH2+rs1805120	115 bp	59.99	91,1°C
CTCTCCCTACACCACCTGCC	KCNH2-rs1805120		61.62	
GTGACCTTTGACCCTAAAGGAGA	MYH7+rs7157716	167 bp	59.67	89,6°C
TTGCCTCCTCGGCCTGAA	MYH7-rs7157716		60.54	
TTCCAGAGACATGGCCGGA	DSG+rs2278792	137 bp	60.61	85,3°C
CACATTCACATACAAATGTTCCCC	DSG-rs2278792		58.59	
CATTAATCAGCAGAACAGTAAGATTGAG	MYH6+rs365990	72 bp	58.94	84°C
TCCTTCAGTTTCTTCTGTAGTTGAAG	MYH6-rs365990		59.01	

GTCTGACATGCTCCCATGCG	CBS+rs1801181	180 bp	61.43	88.3°C
GAATGACCACGCAGCGCT	CBS-rs1801181		61.12	
TGCGCTACGCACTCCTCC	GAA+1800310	100 bp	62.15	85.6°C
TAGGCTACTACTCCAGGAAGAGG	GAA-1800310		62.65	
TCAATGCCAACGAGGAGGTG	KCNH2+740952	88 bp	60.32	83,4°C
CGGCCACCATGTGCGATGA	KCNH2-740952		59.81	
TGAGCCACTTCTATAAACTGAGTAAG	AKAP9+rs6960867	149 bp	60.79	77°C
CTTCTTCTGAGGAACATTCACTCTGTAA	AKAP9-rs6960867		60.95	
CAGACTGGCGAGGTGAACTAC	AKAP9+rs28927678	156 bp	60.4	79°C
CCTGTTCTTGATTCTCTGTTCCAAAC	AKAP9-rs28927678		60.52	

## Verwendete Referenzproben

**Tabelle 32: Tabelle mit allen verwendeten Referenzproben sowie ihrer Genotypen bezüglich der untersuchten Gene in der HRM-PCR**

Genotyp von ...	<b>DES</b> rs1058261	<b>KCNH2</b> rs1805120	<b>MYH7</b> rs7157716	<b>DSG2</b> rs2278792	<b>MYH6</b> rs365990	<b>KCNH2</b> rs740952	<b>GAA</b> rs1800310	<b>AKAP9</b> rs28927678	<b>AKAP9</b> rs6960867
<b>12446</b>	WT	HET	HET	HOM	HET	-	-	-	-
<b>12480</b>	HOM	WT	WT	HOM	WT	-	-	-	-
<b>12466</b>	HOM	HET	HET	HOM	HOM	-	-	-	-
<b>11188</b>	HET	HOM	HET	WT	HET	-	-	-	-
<b>1408</b>	HET	HET	WT	HET	WT	-	-	-	-
<b>12524</b>	HOM	HET	HOM	WT	HET	-	-	-	-
<b>12195</b>	WT	WT	HOM	HET	HOM	-	-	-	-
<b>12974</b>	-	-	-	-	-	HET	HET	WT	WT
<b>12631</b>	-	-	-	-	-	HET	HET	WT	WT
<b>12397</b>	-	-	-	-	-	WT	HOM	HET	HET
<b>12675</b>	-	-	-	-	-	HOM	WT	HOM	HOM
<b>12627</b>	-	-	-	-	-	HOM	WT	HOM	HOM
<b>12662</b>	-	-	-	-	-	WT	HOM	HET	HET

*WT=Wildtyp, HET=heterozygoter Genotyp, HOM=homozygoter Genotyp. Bei den Feldern, die mit einem einfachen – gekennzeichnet sind, sind die Genotypen nicht relevant, da sie in dem jeweiligen Run nicht analysiert wurden.*

## Klassifizierung der Genvarianten

**Tabelle 33: Übersicht der Klassifizierung bei potentiell kausalen Genvarianten bei zuvor analysierten Patienten**

Patienten-ID der Proben	Genvariante	PPTs	Bekannt in Datenbanken?	Häufigkeit in Vergleichspopulationen	Z-Score	Klassifizierung
12026-1	MYBPC3 c.3791G>T	++ (2/2)	x (HGMD <sup>®</sup> , ClinVar <sup>®</sup> , Uniprot <sup>®</sup> , dbSNP <sup>®</sup> )	nicht bekannt	0,69	<b>Kl. 5</b>
12026-1	DSP c.4109T>A	++ (2/2)	-	nicht bekannt	0,91	<b>Kl. 4</b>
12026-1	DSC2 c.1750A>G	+ (1/2)	-	0,0041% (ALL)	-0,12	<b>Kl. 3</b>
622-1	CALR3 c.356A>G	+ (1/2)	x (dbSNP <sup>®</sup> )	0,0011% (ALL)	-0,1	<b>Kl. 3</b>
12294-1	TTN c.44998A>G	+ (2/2)	x (ClinVar <sup>®</sup> ) als VUS für Kardio- und Sarko- myopathien	0,029% (NFE)	-	<b>Kl. 3</b>
12294-1	TGFB2 c.161dup	-	-	unbekannt	2,63	<b>Kl. 3</b>
12432-1	TGB3 c.806A>G	++ (2/2)	x (dbSNP <sup>®</sup> )	0,0045% (NFE)	2,2	<b>Kl. 3</b>
12126-1	ANK2 c.10831G>A	++ (2/2)	x (dbSNP <sup>®</sup> )	0,0067% (NFE)	1,06	<b>Kl. 3</b>
12590-1	PKP2 c.1664del	++ (2/2)	x (HGMD <sup>®</sup> , ClinVar <sup>®</sup> , dbSNP <sup>®</sup> ) als pathogen für ARVC/D	nicht bekannt	-0,08	<b>Kl. 5</b>
12644-1	SGCD c.731 C>T	++ (2/2)	-	0,005%	-0,23	<b>Kl. 3</b>
11441-1	DSG2 c.1003A>G	- (2/2)	x (HGMD <sup>®</sup> , ClinVar <sup>®</sup> , UniProt <sup>®</sup> , dbSNP <sup>®</sup> ) als <i>likely pathogenic</i> und VUS für ARVC/D	0,066%	-1,2	<b>Kl. 4</b>
12489-1	MURC c.1091C>T	+ (1/2)	x (HGMD <sup>®</sup> ) als disease causing für DCM	0,0040%	-1,22	<b>Kl. 4</b>
12047-1	DSP c.7994C>T	+ (1/2)	x (ClinVar <sup>®</sup> ) als VUS für kardiovaskulären Phänotyp	0,0095%	0,91	<b>Kl. 3</b>
12047-1	LDLR c.1705+1G>T	-	führt wahrscheinlich zu Skip von Intron 11			<i>Incidental finding</i>
12181-1	RBM20 c.3584	++ (2/2)	x (HGMD <sup>®</sup> , ClinVar <sup>®</sup> , dbSNP <sup>®</sup> ) als <i>likely pathogenic</i> und VUS für NCCM bzw. DCM	0,076	-	<b>Kl. 4</b>
12003-3	DTNA c.2195T>C	++ (2/2)	x (dbSNP <sup>®</sup> )	0,0018%	1,17	<b>Kl. 4</b>
11014-3	DSP c.293G>C	++ (2/2)	-	unbekannt	0,91	<b>Kl. 4</b>

12583-1	DSG2 c.2405A>G	+	x (ClinVar <sup>®</sup> , dbSNP <sup>®</sup> ) als VUS für ARVC/D und DCM	0,0054% (NFE)	-1,20	<b>Kl. 3</b>
12158-1	ACTN2 c.1657_1658 del	++	-	unbekannt	1,76	<b>Kl. 4</b>
11122-3	DSP c.2616dup	++	-	unbekannt	0,91	<b>Kl. 5</b>
12576-1	DES c.407T>C	++	x (HGMD <sup>®</sup> , ClinVar <sup>®</sup> , Uniprot <sup>®</sup> ) <i>disease causing</i> bzw. <i>likely pathogenic</i> für DCM	unbekannt	2,34	<b>Kl. 4</b>
12100-1	SCN5A c.193C>T	++	-	nicht bekannt	2,53	<b>Kl. 4</b>
12100-1	DSC2 c.510C>G	++	-	nicht bekannt	-1,02	<b>Kl. 5</b>
12100-1	RBM20 c.686A>G	+	x (ClinVar <sup>®</sup> ) als VUS für <i>‘cardiovascular phenotype’</i>	nicht bekannt	-	<b>Kl. 3</b>
12144-1	DSG2 c.857_860del	+	-	nicht bekannt	-1,20	<b>Kl. 5</b>
12144-1	KCNH2 c.3400C>T	-	x (dbSNP <sup>®</sup> )	0,0025%	4,81	<b>Kl. 5</b>
12144-1	AKAP9 c.2836 G>C	+(1/2)	x (dbSNP <sup>®</sup> )	0,00081%	2,75	<b>Kl. 3</b>
12135-1	CACNB2 c.265G>A	+(1/2)	x (ClinVar <sup>®</sup> , dbSNP <sup>®</sup> ) als VUS für Brugada	0,0040% (ALL)	0,36	<b>Kl. 3</b>
12507-1	ABCC9 c.3475del	+(1/2)	-	0,0009% (NFE)	4,89	<b>Kl. 5</b>
12507-1	TRDN c.691A>G	++	x (dbSNP <sup>®</sup> )	0,0009% (NFE)	-1,76	<b>Kl. 3</b>
12438-1	CACNA1C c.2399A>C	+	-	0,001% (NFE)	6,41	<b>Kl. 4</b>
11420-1	DES c.1040G>A	++	-	-	2,34	<b>Kl. 3</b>
11420-1	RYR2 c.4096G>C	++	x (HGMD <sup>®</sup> , dsSNP <sup>®</sup> ) als <i>disease causing</i> / VUS für SCD und Kardiomyopathie	0,011%	5,21	<b>Kl. 4</b>
12657-1	LMNA c.1232dup	++	-	-	3,37	<b>Kl. 4</b>
11979-1	DES c.1205T>C	++	x (dbSNP <sup>®</sup> )	-	2,34	<b>Kl. 4</b>

## Untersuchte Gene mit den Genpanel ,*TruSight Cardio*' (174 Gene)

ABCC9, ABCG5, ABCG8, ACTA1, ACTA2, ACTC1, ACTN2, AKAP9, ALMS1, ANK2, ANKRD1, APOA4, APOA5, APOB, APOC2, APOE, BAG3, BRAF, CACNA1C, CACNA2D1, CACNB2, CALM1, CALR3, CASQ2, CAV3, CBL, CBS, CETP, COL3A1, COL5A1, COL5A2, COX15, CREB3L3, CRELD1, CRYAB, CSRP3, CTF1, DES, DMD, DNAJC19, DOLK, DPP6, DSC2, DSG2, DSP, DTNA, EFEMP2, ELN, EMD, EYA4, FBN1, FBN2, FHL1, FHL2, FKRP, FKTN, FXN, GAA, GATAD1, GCKR, GJA5, GLA, GPD1L, GPIHBP1, HADHA, HCN4, HFE, HRAS, HSPB8, ILK, JAG1, JPH2, JUP, KCNA5, KCND3, KCNE1, KCNE2, KCNE3, KCNH2, KCNJ2, KCNJ5, KCNJ8, KCNQ1, KLF10, KRAS, LAMA2, LAMA4, LAMP2, LDB3, LDLR, LDLRAP1, LMF1, LMNA, LPL, LTBP2, MAP2K1, MAP2K2, MIB1, MURC, MYBPC3, MYH11, MYH6, MYH7, MYL2, MYL3, MYLK, MYLK2, MYO6, MYOZ2, MYPN, NEXN, NKX2-5, NODAL, NOTCH1, NPPA, NRAS, PCSK9, PDLIM3, PKP2, PLN, PRDM16, PRKAG2, PRKAR1A, PTPN11, RAF1, RANGRF, RBM20, RYR1, RYR2, SALL4, SCN1B, SCN2B, SCN3B, SCN4B, SCN5A, SCO2, SDHA, SEPN1, SGCB, SGCD, SGCG, SHOC2, SLC25A4, SLC2A10, SMAD3, SMAD4, SNTA1, SOS1, SREBF2, TAZ, TBX20, TBX3, TBX5, TCAP, TGFB2, TGFB3, TGFB1, TGFB2, TMEM43, TMPO, TNNC1, TNNI3, TNNT2, TPM1, TRDN, TRIM63, TRPM4, TTN, TTR, TXNRD2, VCL, ZBTB17, ZHX3, ZIC3



## B. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Einteilung der primären Kardiomyopathien.....	2
Abbildung 2: Schematische Darstellung der DCM im Vergleich zum gesunden Herzen.....	5
Abbildung 3: Typische Bilder von ventrikulären Tachykardien (VT) eines Patienten mit CPVT (18).....	6
Abbildung 4: Veränderung des Myokards im Krankheitsverlauf (22) .....	7
Abbildung 5: Aufbau einer desmosomalen Zell-Zell-Verbindung (25).....	8
Abbildung 6: Ablauf einer NGS (28).....	17
Abbildung 7: Sequenzierungsablauf (27) .....	19
Abbildung 8: Darstellung der emittierten Fluoreszenz (27).....	20
Abbildung 9: Ergebnis der Analyse der Probe ,12644-1 ‘ im Agilent BioAnalyzer® .....	23
Abbildung 10: Beispielhaftes Ergebnis der Analyse der Probe 11129-3 im Agilent BioAnalyzer®.....	25
Abbildung 11: Graphische Darstellung des BioAnalyzer® Ergebnisses .....	28
Abbildung 12: Ablauf einer klassischen PCR (37) .....	31
Abbildung 13: Elektrophorese Ergebnis .....	39
Abbildung 14: Sequenzanalyse des Exon 22 von RYR2.....	41
Abbildung 15: Schmelzverhalten von dsDNA (31).....	43
Abbildung 16: Schmelzverhalten zweier DNA-Proben (31) .....	43
Abbildung 17: Multiplex-HRM-PCR .....	48
Abbildung 18: Übersicht über detektierte Varianten bei den 14 eigenständig analysierten Patienten.....	52
Abbildung 19: Detektierte Varianten bei den 14 selbstständig analysierten Patienten.....	57
Abbildung 20: Missense-Mutation (C>T) im KCNJ2-Gen an der Position c.244.....	58
Abbildung 21: Missense-Mutation (G>A) im MYH7-Gen an Position c.1633 .....	59
Abbildung 22: frame-shift-Mutation durch Duplikation von ACAA im TTN-Gen an Position c.47884_47887.....	61
Abbildung 23: frame-shift Mutation durch Deletion der Base A im TTN-Gen an Position c.2075.....	62
Abbildung 24: frame-shift Mutation im DSG2-Gen durch Deletion von GGC an Position c.828+2.....	63

<i>Abbildung 25: missense-Mutation (G&gt;C) im SCN5A-Gen an Position c.5350.....</i>	<i>64</i>
<i>Abbildung 26: missense Mutation C&gt;T im LMNA-Gen an Position c.568.....</i>	<i>66</i>
<i>Abbildung 27: Heterozygote Missense-Mutation (G&gt;A) im LAMA4-Gen an Position c.4405.....</i>	<i>67</i>
<i>Abbildung 28: missense Variante (G&gt;A) im PKP2-Gen an Position c.1742.....</i>	<i>68</i>
<i>Abbildung 29: missense Variante (C&gt;T) im RYR2-Gen an Position c.2444.....</i>	<i>68</i>
<i>Abbildung 30: Aufteilung der Patienten anhand der bei ihnen detektierten Varianten .....</i>	<i>70</i>
<i>Abbildung 31: Altersverteilung der in die Untersuchung eingeschlossenen Patienten .....</i>	<i>72</i>
<i>Abbildung 32: Anteil der untersuchten Proben mit positivem Genbefund (Mutation oder VUS) bzw. ohne kausale Genmutation .....</i>	<i>72</i>
<i>Abbildung 33: Verhältnis der Gene mit detektierten Varianten zueinander .....</i>	<i>73</i>
<i>Abbildung 34: Darstellung der Gene, in denen Mutationen identifiziert wurden, entsprechend ihrer Kausalität für Arrhythmien bzw. Kardiomyopathien .....</i>	<i>74</i>
<i>Abbildung 35: Aufteilung der 19 Varianten der Klassen 4 und 5 entsprechend der durch das Gen verursachten Kardiomyopathie.....</i>	<i>75</i>
<i>Abbildung 36: Aufteilung der 7 Varianten der Klasse 4 und 5 entsprechend der durch das Gen verursachten Arrhythmie .....</i>	<i>76</i>
<i>Abbildung 37: Normalisierte Schmelzkurve der HRM-PCR mit vier SNPs (rs1058261, rs1805120, rs7157716, rs365990) .....</i>	<i>77</i>
<i>Abbildung 38: Normalisierte Schmelzkurve des rs365990-SNPs (MYH6).....</i>	<i>78</i>
<i>Abbildung 39: HRM-PCR mit MiSeq<sup>®</sup>-Proben (SNP: rs365990).....</i>	<i>78</i>
<i>Abbildung 40: Schmelzkurve des rs365990-SNPs (MYH6).....</i>	<i>79</i>
<i>Abbildung 41: Normalisierte Schmelzkurve des rs1058261-SNPs (DES).....</i>	<i>80</i>
<i>Abbildung 42: Schmelzkurve des rs1058261-SNPs (DES) im Intervall von 80-82,4°C.....</i>	<i>80</i>
<i>Abbildung 43: Normalisierter Graph des rs7157716-SNPs (MYH7) .....</i>	<i>81</i>
<i>Abbildung 44: Darstellung der Schmelzkurven des rs7157716-SNPs (MYH7) .....</i>	<i>81</i>
<i>Abbildung 45: Normalisierte Schmelzkurve des rs1805120-SNPs (KCNH2).....</i>	<i>82</i>
<i>Abbildung 46: Schmelzkurven von rs1805120 im Temperaturintervall von 84,2-85,8°C .....</i>	<i>82</i>

<i>Abbildung 47: Schmelzkurve des HRM-PCR-Multiplex Run mit vier SNPs (rs1800310, rs740952, rs28927678, rs6960867) .....</i>	<i>83</i>
<i>Abbildung 48: Normalisierte Schmelzkurve des rs1800310-SNPs .....</i>	<i>84</i>
<i>Abbildung 49: Schmelzkurve des rs1800310-SNPs (GAA) .....</i>	<i>84</i>
<i>Abbildung 50: Darstellung der normalisierten Schmelzkurve des rs740952-SNPs (KCNH2) .....</i>	<i>85</i>
<i>Abbildung 51: Darstellung des rs740952-SNPs (KCNH2).....</i>	<i>85</i>
<i>Abbildung 52: Normalisierte Funktion des rs28927678-SNPs (AKAP9).....</i>	<i>86</i>
<i>Abbildung 53: Schmelzkurven des rs28927678-SNPs (AKAP9).....</i>	<i>86</i>
<i>Abbildung 54: Darstellung der normalisierten Schmelzkurve des rs6960867-SNPs (AKAP9).....</i>	<i>87</i>
<i>Abbildung 55: Schmelzkurven des rs6960867-SNPs (AKAP9).....</i>	<i>87</i>
<i>Abbildung 56: Ergebnisse des HRM-PCR Durchlaufs bezüglich des rs1800310-SNPs mit 10 MiSeq<sup>®</sup> Proben und 3 Kontrollen.....</i>	<i>88</i>
<i>Abbildung 57: HRM-PCR mit MiSeq<sup>®</sup> Proben im Schmelzbereich des rs740952-SNPs (KCNH2) .....</i>	<i>89</i>
<i>Abbildung 58: Schmelzkurven des rs6960867-SNPs (AKAP9) mit MiSeq<sup>®</sup> Proben.....</i>	<i>89</i>
<i>Abbildung 59: Überschneidungen der als kausal eingestuftene Gene für Kardiomyopathien.....</i>	<i>100</i>
<i>Abbildung 60: Methodik des SNaPshot<sup>®</sup> Genotyping (71).....</i>	<i>103</i>

## C. Tabellenverzeichnis

<i>Tabelle 1: verwendeten Geräte mit Modell- und Herstellerbezeichnung.....</i>	<i>13</i>
<i>Tabelle 2: verwendeten Chemikalien und Kits mit Herstellerbezeichnung.....</i>	<i>14</i>
<i>Tabelle 3: verwendete Software mit Herstellerbezeichnung.....</i>	<i>15</i>
<i>Tabelle 4: verwendete Verbrauchsmaterialien mit Herstellerangabe.....</i>	<i>15</i>
<i>Tabelle 5: Ansatz der Primer im Well .....</i>	<i>23</i>
<i>Tabelle 6: Thermocyclerprogramm (NLA-PCR).....</i>	<i>24</i>
<i>Tabelle 7: Cycler Programm ‚NRC HYB‘ zur Hybridisierung der Library.....</i>	<i>26</i>
<i>Tabelle 8: Reaktionsansatz für den PCR-Mastermix .....</i>	<i>28</i>
<i>Tabelle 9: Verdünnungsschema für die zu untersuchenden Proben .....</i>	<i>29</i>
<i>Tabelle 10: Rotor Gene® Programm für qPCR.....</i>	<i>29</i>
<i>Tabelle 11: Primer Gebrauchslösung 15pmol/Ansatz für 30 Proben .....</i>	<i>36</i>
<i>Tabelle 12: MasterMix Zusammensetzung für 18 Proben.....</i>	<i>37</i>
<i>Tabelle 13: PCR-Programm P65-55_2.....</i>	<i>37</i>
<i>Tabelle 14: PCR-Programm P65-55_3.....</i>	<i>37</i>
<i>Tabelle 15: MasterMix Zusammensetzung für 12 Proben.....</i>	<i>38</i>
<i>Tabelle 16: Reaktionsansatz für den SEQ-Mastermix (berechnet für 20 Probenansätze).....</i>	<i>40</i>
<i>Tabelle 17: Thermo Cycler Programm ‚SEQ S50‘ .....</i>	<i>40</i>
<i>Tabelle 18: HRM PCR-Ansatz.....</i>	<i>45</i>
<i>Tabelle 19: Protokoll des HRM-PCR Programms .....</i>	<i>46</i>
<i>Tabelle 20: Ausgewählte SNPs für die HRM-PCR.....</i>	<i>47</i>
<i>Tabelle 21: Allelfrequenzen der untersuchten SNPs.....</i>	<i>49</i>
<i>Tabelle 22: Detektierte Varianten (MAF&lt;0.05%, mit Effekt auf Proteinebene) .....</i>	<i>53</i>
<i>Tabelle 23: Einschätzung der Pathogenität unter Berücksichtigung der Pathogenitäts-vorhersageprogramme, der Häufigkeit in Vergleichspopulationen sowie den Einträgen in Datenbanken .....</i>	<i>56</i>
<i>Tabelle 24: Eigenschaften der entworfenen Amplikone zu den SNPs sowie der Primer.....</i>	<i>90</i>

<i>Tabelle 25: Gegenüberstellung des in der MiSeq® ermittelten Genotyps (grün markiert) mit dem in der HRM-PCR ermittelten Genotyp (blau markiert, Richtigkeit ist angegeben in %)</i> .....	91
<i>Tabelle 26: Kardiomyopathien und ihre Hauptgene sowie Überschneidungen zwischen diesen</i> .....	100
<i>Tabelle 27: Klinische Phänotypen der eigenständig sequenzierten Patienten</i> .....	I
<i>Tabelle 28: Kriterien zur Klassifizierung einer potentiell-kausalen Varianten</i> .....	III
<i>Tabelle 29: Kriterien zur Einordnung einer potentiell benignen Variante als benigne oder wahrscheinlich benigne</i> .....	IV
<i>Tabelle 30: Klassifizierungskriterien für die Einordnung von detektierten Varianten</i> .....	V
<i>Tabelle 31: Verwendete Primer der Marke eurofins Genomics</i> .....	V
<i>Tabelle 32: Tabelle mit allen verwendeten Referenzproben sowie ihrer Genotypen bezüglich der untersuchten Gene in der HRM-PCR</i> .....	VI
<i>Tabelle 33: Übersicht der Klassifizierung bei potentiell kausalen Genvarianten bei zuvor analysierten Patienten</i> .....	VII

## D. Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
A	Adenin
Abb.	Abbildung
AHA	<i>American Heart Assoziation</i>
ARVC/D	Arrhythmogene rechtsventrikuläre Kardiomyopathie / Dysplasie
AUCM	Arrhythmogene unklassifizierte Kardiomyopathie
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
°C	Grad Celsius
C <sub>t</sub>	engl. <i>cycle threshold</i> , Schwellenwertzyklus
ca.	circa
CALM2	Calmodulin
CASQ2	Calsequestrin 2
CPVT	catecholaminerge polymorphe ventrikuläre Tachykardie
DCM	Dilatative Kardiomyopathie
ddNTP	Didesoxynucleotidtriphosphat
DES	Desmin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynucleotidtriphosphat
dsDNA	doppelsträngige Desoxyribonukleinsäure
DSG2	Desmoglein 2
DSP	Desmoplakin
ddNTP	Didesoxynucleotidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EE1	<i>Enrichment Elution Buffer</i>
EHB	<i>Enrichment Hybridization Buffer</i>
EKG	Elektrokardiogramm
ESC	<i>European Society of Cardiology</i>
ET2	<i>Elute Target Buffer 2</i>
et al.	lat: et alii
EWS	Enrichment Wash Solution
G	Guanin
g	Erdbeschleunigung
GB	Gigabyte
gfh	Gesellschaft für Humangenetik
ggf.	gegebenenfalls
HCM	Hypertrophe Kardiomyopathie
HGMD	<i>Human Gene Mutation Database</i>
HET	heterozygot
HOM	homozygot
HP3	2N NaOH
HRM	<i>High Resolution Melt</i>
HS	<i>High Sensitivity</i>
HT1	Hybridisierungspuffer
ICD	Implantierbarer Cardioverter-Defibrillator
IfGH	Institut für Genetik von Herzerkrankungen
JUP	Plakoglobin

K	Kalium
KHK	Koronare Herzerkrankung
kb	Kilobasen
KCNH2	spannungsgesteuerter Kaliumkanal der Subfamilie H, Mitglied 2
LIF	Laser-induzierter Fluoreszenz
LMNA	Laminin A/C
LQTS	Long QT-Syndrom
LVEDD	linksventrikulärer enddiastolischer Durchmesser
LVNC	linksventrikuläre Non-Compaction Kardiomyopathie
LV	linker Ventrikel
LZ-EKG	Langzeit-Elektrokardiogramm
µl	Mikroliter
MAF	engl. <i>minor allele frequency</i>
MGPS	Multi-Gen-Panel-Sequenzierung
Min	Minute(n)
MRT	Magnetresonanztomographie
Mut.	Mutation
MYH6 / 7	Myosin
NaOH	Natriumhydroxid
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NEM	<i>Nextera Enrichment Amplification Mix</i>
NLM	<i>Nextera library Amplification Mix</i>
nM	Nanomolar
NTC	engl. <i>No Template Control</i>
o.J.	Ohne Jahr
PBS	engl. <i>phosphate buffered saline</i> , Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	engl. <i>polymerase chain reaction</i> , Polymerase Kettenreaktion
PGM	<i>Personal Genome Machine</i>
PKP2	Plakophilin-2
pM	pikomolar
qPCR	quantitative Polymerase-Kettenreaktion
RCM	Restriktive Kardiomyopathie
RNA	Ribonucleinsäure
RNase	Ribonuclease
rpm	engl. <i>rounds per minute</i> , Runden pro Minute
RSB	<i>Resuspension Buffer</i>
RT	Raumtemperatur
RV	Rechter Ventrikel
s	Sekunde(n)
S.	Seite
s.	siehe
SMB	<i>Streptavidin Magnetic Beads</i>
SNP	engl. <i>Single Nucleotide Polymorphism</i> , Einzelnukleotid-Polymorphismus
Sog.	sogenannte
SPB	<i>Sample Purification Beads</i>
ST	<i>Stop Tagment Buffer</i>
T	Thymin
T <sub>m</sub>	Schmelztemperatur
TCO	TruSight Cardio Oligos

TD	Tagment DNA Buffer
TDE1	Tagment DNA Enzyme
TRD	Triadin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TTN	Titin
u.a.	unter anderem
UKM	Universitätsklinikum Münster
VT	Ventrikuläre Tachykardie
VUS	Variante unklarer Signifikanz
WHO	Weltgesundheitsorganisation
WT	Wildtyp
Z.n.	Zustand nach