

Sarah Runge
Dr. med.

Mutationsanalysen des Ankyrin 2-Gens bei Patienten mit Langem QT-Syndrom

Geboren am 15.11.1979 in Heidelberg
(Staats-)Examen am 16.06.2006 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Innere Medizin
Doktorvater: Prof. Dr. med. Rüdiger Becker

Ankyrin B ist ein Protein, das Bestandteil eines makromolekularen Komplexes im T-Tubulus-System der Kardiomyozyten ist und eine wichtige Rolle bei der zytosolischen Kalziummodulation spielt. Es bindet individuell an den Natrium-Kalzium-($\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -)Austauscher, die Natrium-Kalium-(Na^+/K^+ -)ATPase und den Inositol 1,4,5-Triphosphat-(InsP_3 -)Rezeptor und fungiert als Adapter zur funktionellen Kopplung dieser Proteine untereinander. Weiterhin ist Ankyrin B für die Proteinsortierung und den –transport von Bedeutung, womit ihm neben der Funktion als Zytoskelettprotein eine wichtige Regulatorfunktion zukommt. Ankyrin B besteht aus vier verschiedenen Domänen, wobei man bislang davon ausging, dass vor allem Mutationen im Bereich der Regulatorischen Domäne zu funktionellen Veränderungen des Proteins führen. Ankyrin B Mutationen verursachen ein Langes QT-Syndrom vom Typ 4 und gehen mit dem Risiko eines plötzlichen Herztodes einher. Da sich die Herzrhythmusstörungen darüber hinaus jedoch von den klassischen LQT-Syndromen, die typischerweise durch Veränderungen in einem Ionenkanal-Gen hervorgerufen werden, unterscheiden, klassifiziert man den Phänotyp, der durch eine Mutation im ANK2-Gen verursacht wird, genauer als „Ankyrin B-Syndrom“. Dieses geht mit Bradykardien bei Sick-Sinus-Syndrom, Episoden von Vorhofflimmern, polymorphen ventrikulären Tachykardien und polyphasischen T-Wellen einher. Auf zellulärer Ebene zeigt sich, dass Mutationen im ANK2-Gen neben Veränderungen der Ventrikulärmyozyten auch Bereiche des Vorhofs und des Leitungssystems beeinflussen und somit auch eine Affektion von Leitungsfasern und Schrittmacherzellen verursachen können.

Nachdem eine größere Anzahl von Personen genetisch hinsichtlich einer ANK2-Mutation untersucht wurde, zeigte sich, dass klinisch unauffällige Träger einer ANK2-Mutation kein seltenes Phänomen sind; letzteres lässt darauf schließen, dass Mutationen im ANK2-Gen insgesamt häufiger vorkommen als zunächst erwartet. Die bislang publizierten Arbeiten zu Mutationsanalysen des ANK2-Gens fokussierten die Analyse auf spezifisch ausgewählte Exons, die im Bereich der Regulatorischen Domäne und der hier angrenzenden Areale lokalisiert sind.

Ziel der hier vorliegenden Arbeit war es, bei einem Patientenkollektiv, das eine Verlängerung des QT-Intervalls ($\text{QT}_c \geq 440$ ms) im EKG aufwies, eine Mutationsanalyse im gesamten ANK2-Gen durchzuführen. Hierfür wurde genomische DNA aus peripheren Blutlymphozyten gewonnen. Alle 45 Exons der im Myokard exprimierten, alternativ gespleißten Variante 2 wurden mit Hilfe der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR), mittels Single-Strand Conformation Polymorphism (SSCP)-Gelanalyse und in ausgewählten Fällen auch mittels direkter Sequenzierung untersucht.

Insgesamt konnten bei 17 verschiedenen Exons, die alle vier verschiedenen Domänen des ANK2-Gens umfassen, Varianten mittels SSCP-Analyse nachgewiesen werden. Es erfolgte eine initiale Einteilung der Varianten in Mutationen und Polymorphismen, wobei hier als primäres Kriterium die Häufigkeit des Auftretens der Varianten herangezogen wurde. Bei den als Mutationen klassifizierten Varianten wurde anschließend eine Sequenzanalyse

durchgeführt, wobei sich hierbei diverse Mutationstypen identifizieren ließen. Im Einzelnen wurden eine synonyme Punktmutation (Exon 11), drei non-synonyme Punktmutationen (Exon 16, 35, 45), eine Deletion (Exon 22) und drei Mutationen im Intron (Exon 16, 20, 35), von denen eine im Bereich der Spleiß-Donor-Seite lokalisiert ist (Exon 35), identifiziert. Die non-synonyme Punktmutation im Exon 16 liegt in einer hoch konservierten Region der Membranbindungsdomäne und Überlegungen hinsichtlich Veränderungen der physikalisch-chemischen Eigenschaften durch den Aminosäureaustausch, lassen eine funktionelle Relevanz der Mutation wahrscheinlich erscheinen. Die Deletion in Exon 22 führt zum Verlust dreier Aminosäuren und zur Verschiebung des Leserasters und hat den Verlust eines Threonins zur Folge. Konsequenzen hinsichtlich der Proteinfunktion sind hier ebenfalls wahrscheinlich. Im Exon 35 konnte eine Mutation bei einer Kontroll-Probe, die klinisch asymptomatisch war, identifiziert werden. Darüber hinaus wurde in Exon 35 eine Mutation im Bereich der Spleiß-Seite gefunden. Bei dieser Mutation könnte es im Rahmen einer fehlerhaften Erkennung der Spleiß-Donor-Seite zu einem Verlust des Exons 36 kommen, welches ein in der Literatur häufiger beschriebenes Phänomen darstellt. Hier stehen weitergehende Untersuchungen noch aus. Im Exon 45 wurde eine non-synonyme Punktmutation identifiziert. Diese Mutation (ANK2-E1813K) ist in der Literatur bereits beschrieben. Bei der betroffenen Patientin hatte sich im Vorfeld dieser Arbeit bereits eine bisher nicht beschriebene Mutation in einem anderen LQTS-Gen, nämlich im KCNH2-Gen (KCNH2-H562R), gezeigt. Im ANK2-Gen liegt eine Punktmutation an Position 5437 (G zu A) im Exon 45 vor, die zu einem Aminosäureaustausch von Glutamat zu Lysin im Codon 1813 führt. Diese publizierte Mutation war bei zwei Patienten mit dem Auftreten von ventrikulären Tachykardien bzw. einem LQTS und Kammerflimmern assoziiert [72]. Im KCNH2-Gen liegt eine Punktmutation an Position 1685 (A zu G) im Exon 7 vor, die einen Aminosäureaustausch von Histidin zu Arginin im Codon 562 zur Folge hat.

Die Indexpatientin zeigte initial eine verlängerte QT_c-Zeit von 537 ms im EKG. Aufgrund eines symptomatischen AV-Blocks II. Grades wurde 1976 eine Schrittmacher-Implantation durchgeführt. In der Folgezeit traten multiple Synkopen bei TdP-Tachykardien auf. 1989 erfolgte eine ICD-Implantation nach kardiopulmonaler Reanimation bei Kammerflimmern. In den letzten Lebensjahren war die Patientin komplett schrittmacherabhängig und zeigte eine absolute Arrhythmie bei Vorhofflimmern. Darüber hinaus wurde 2003 echokardiographisch der Verdacht auf eine strukturelle Veränderung des rechten Ventrikels, mit Sakkulationen rechts basal, geäußert. Die Patientin verstarb 2004 im Alter von 72 Jahren an einer primär nicht-kardialen Ursache. Die konsekutiv von uns durchgeführte genetische Familienanalyse erbrachte bei zwei weiteren Mitgliedern (Schwester der Indexpatientin [Klinik: 66J., Schrittmacher-Implantation 1995 wegen Bradykardie, komplette Schrittmacher-Abhängigkeit] und deren Tochter [Klinik: 36J., rezidivierende Synkopen in der Jugend]) die ANK2-E1813K Mutation und bei einer weiteren Schwester der Indexpatientin die KCNH2-H562R Mutation [Klinik: 67J., asymptomatisch].

Diese Arbeit zeigt, dass ANK2-Mutationen im Bereich aller vier Domänen bei Patienten mit LQTS vorkommen. Es konnte ein breites Spektrum unterschiedlichster Mutations-Typen gefunden werden. Es wird des Weiteren gezeigt, dass es, wie auch in der aktuellen Literatur beschrieben, genotypisch positive, aber klinisch asymptomatische Personen gibt. Anhand einer doppelt heterozygoten Mutation im ANK2-Gen und KCNH2-Gen (ANK2-E1813K/KCNH2-H562R) konnte ein aggravierter Phänotyp mit multiplen Rhythmusstörungen bei einer LQTS-Patientin demonstriert werden. Im Vergleich dazu sind Mutantenträger mit jeweils nur einer dieser Mutationen klinisch asymptomatisch (KCNH2-H562R) bzw. oligosymptomatisch (ANK2-E1813K). Die Identifikation von doppelt heterozygoten und compound heterozygoten Mutationen in LQTS-Kandidatengen ist ein Erklärungsansatz für die große Variabilität im Phänotyp des LQTS. Über die definitive klinische Relevanz kann im Rahmen dieser Arbeit keine Aussage gemacht werden, da eine

funktionelle Evaluation der einzelnen Mutationen in vitro, beispielsweise mittels Zellmodellen oder Tiermodellen, noch nicht erfolgt ist. Die Daten weisen aber, vor allem durch die Untersuchung der doppelt heterozygoten Mutation ANK2-E1813K/KCNH2-H562R, darauf hin, dass ANK2-Varianten als Modulatoren humaner Arrhythmien fungieren und bestärken die Rolle von Proteininteraktionen sowie die Regulation normaler kardialer Elektrogenese durch Ankyrin B.