

Aus dem Friedrich-Baur-Institut der Medizinischen Fakultät  
an der Neurologischen Klinik und Poliklinik  
der Ludwig-Maximilians-Universität München  
(Direktorin: Prof. Dr. med. Marianne Dieterich)

**Genotypische und phänotypische Charakterisierung hereditärer  
Einschlusskörpermyopathien**

Dissertation zum Erwerb des Doktorgrades der Humanmedizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von  
Angelo Aleo  
aus  
Stuttgart  
2009

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. med. Maggie Walter

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. Jochen Herms  
Prof. Dr. med. Florian Heinen

Mitbetreuung durch die  
promovierte Mitarbeiterin: Dr. med. Dr. phil. Sabine Krause

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. Maximilian Reiser, FACR,  
FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 29.10.2009

**Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht in:**

Krause S., **Aleo A.**, Hinderlich S., Merlini L., Tournev I., Walter M.C., Argov Z., Mitrani-Rosenbaum S. and Lochmüller H.

GNE protein expression and subcellular distribution are unaltered in HIBM. *Neurology* 2007 Aug 14;69(7):655-9.

# Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung .....	1
2	Einleitung .....	3
2.1	Klassifikation.....	3
2.2	Differentialdiagnosen .....	4
2.3	Sporadische Einschlusskörpermyopathie .....	5
2.3.1	Pathomechanismus .....	5
2.3.2	Klinik .....	6
2.3.3	Therapie.....	6
2.4	Hereditäre Einschlusskörpermyopathie Typ 1.....	7
2.5	Hereditäre Einschlusskörpermyopathie Typ 3.....	7
2.6	Hereditäre Einschlusskörpermyopathie Typ 2.....	8
2.6.1	Pathologie .....	8
2.6.2	Klinik .....	9
2.6.3	Genetik.....	10
2.6.4	Pathomechanismus.....	11
2.7	IBMPFD.....	13
2.7.1	Pathologie .....	13
2.7.2	Klinik .....	14
2.7.3	Genetik.....	15
2.7.4	Pathomechanismus.....	16
3	Zielsetzung .....	19

4	Material und Methoden .....	21
4.1	Patienten und Untersuchungsmaterial .....	21
4.2	Chemikalien.....	22
4.3	Molekulargenetische Methoden .....	22
4.3.1	DNA Extraktion.....	22
4.3.2	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) .....	22
4.3.2.1	Reaktionsbedingungen.....	23
4.3.2.2	PCR-Primer .....	24
4.3.3	Aufreinigung der PCR-Produkte in der Agarose-Gelelektrophorese .....	24
4.3.4	Gelextraktion .....	25
4.3.5	Sequenzanalyse.....	26
4.4	Restriktionsverdau und Restriktionsfragmentlängen-Polymorphismus-Analyse .....	27
5	Ergebnisse.....	28
5.1	Analyse des UDP- <i>N</i> -Acetylglucosamin-2-Epimerase / <i>N</i> -Acetylmannosamin-Kinase ( <i>GNE</i> ) - Gens.....	28
5.1.1	Patient A: Mutationen D378Y und A631V .....	29
5.1.1.1	Klinik.....	29
5.1.1.2	Mutationsanalyse.....	29
5.1.2	Patientin B: Mutationen R246W und A310P .....	30
5.1.2.1	Klinik.....	30
5.1.2.2	Mutationsanalyse.....	31
5.1.3	Patienten C und D: Mutation I587T.....	33
5.1.3.1	Klinik.....	33
5.1.3.2	Mutationsanalyse.....	34
5.2	Analyse des Valosin-Containing Protein ( <i>VCP</i> )-Gens .....	35

5.2.1	Patient A: Mutation R159H .....	35
5.2.1.1	Klinik.....	35
5.2.1.2	Mutationsanalyse.....	36
6	Diskussion .....	37
6.1	Mutationen im <i>GNE</i> -Gen .....	37
6.1.1	Die compound heterozygoten Mutationen D378Y und A631V .....	38
6.1.2	Die compound heterozygoten Mutationen R246W und A310P .....	39
6.1.3	Die „Gypsy“ - Mutation I587T.....	40
6.2	Mutationen im <i>VCP</i> - Gen.....	40
6.2.1	Die Mutation R159H .....	41
6.3	Phänotyp .....	43
6.3.1	Phänotyp bei Patienten mit HIBM2 .....	43
6.3.2	Phänotyp bei Patienten mit IBMPFD .....	44
6.4	Bedeutung molekulargenetischer Analysen für die Diagnostik der Myopathien .....	45
6.4.1	Bedeutung der Diagnostik bei der HIBM2.....	46
6.4.2	Bedeutung der Diagnostik bei der IBMPFD .....	47
7	Literaturverzeichnis.....	49
8	Anhang .....	56
8.1	Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen.....	56
8.2	Primersequenzen .....	60
8.3	Danksagung .....	62
8.4	Lebenslauf.....	63
9	Ehrenwörtliche Erklärung.....	64

# 1 ZUSAMMENFASSUNG

Hereditäre Einschlusskörpermyopathien stellen eine heterogene Gruppe relativ seltener genetisch-bedingter neuromuskulärer Erkrankungen dar.

Die einzelnen Erkrankungen unterscheiden sich untereinander bezüglich Pathogenese, Molekulargenetik und klinischer Symptomatik.

Im Rahmen dieser Arbeit wird der Schwerpunkt auf die hereditäre Einschlusskörpermyopathie Typ 2 (HIBM2) und der IBMPFD gelegt.

Die HIBM2 ist eine autosomal-rezessiv vererbte Erkrankung, die auf einem Defekt im UDP-*N*-Acetylglucosamin-2-Epimerase / *N*-Acetylmannosamin-Kinase (*GNE*) Gen beruht. Dieses Gen ist auf Chromosom 9p12 – p13 lokalisiert und umfasst ein genomisches Intervall von circa 700 kb (Eisenberg, Hochner et al. 2001). Es codiert für das gleichnamige Enzym, das eine Schlüsselrolle in der Biosynthese der Sialinsäure spielt. *GNE* enthält eine N-terminale Epimerasedomäne und eine C-terminale Kinasedomäne. Die HIBM2 wird durch autosomal-rezessive Mutationen verursacht, die sich in beiden funktionellen Domänen des *GNE*-Gens befinden können.

Bis heute sind sechzig Mutationen identifiziert worden, die zu dem Krankheitsbild der HIBM2 führen. Die M712T-Mutation stellt dabei die häufigste Mutation dar. Diese Mutation wird auch als „founder Mutation“ bezeichnet, da sie vor allem bei einer jüdischen Volksgruppe aus dem Iran und dem Mittleren Osten vorkommt (Argov, Eisenberg et al. 2003). Mittlerweile ist diese Mutation auch bei Menschen anderer Herkunft nachgewiesen worden.

Die HIBM2 manifestiert sich meistens zwischen dem 20. und 30. Lebensjahr durch eine Muskelschwäche – und atrophie distaler und proximaler Muskelgruppen, wobei der M. quadriceps femoris typischerweise ausgespart wird. Die Erkrankung verläuft langsam progredient und führt nach circa 15 Jahren zur Rollstuhlpflichtigkeit.

Neben der HIBM2 wurde in dieser Arbeit auch die IBMPFD untersucht. Diese syndromatische Erkrankung ist durch die Trias Einschlusskörpermyopathie, M. Paget und früh auftretende frontotemporale Demenz gekennzeichnet. Die Erkrankung manifestiert sich durchschnittlich zwischen dem 40. und 50. Lebensjahr und beginnt oft mit einer Einschlusskörpermyopathie, die sich in einer zunächst distalen

Muskelschwäche und –atrophie äußern kann. Bei einem Teil der Patienten findet sich initial eine Gliedergürtelschwäche. Auch eine Kardiomyopathie kann hinzutreten. Später im Verlauf können fakultativ ein M. Paget und eine frontotemporale Demenz auftreten. Die Patienten versterben oft an kardialem oder respiratorischem Versagen. Ursächlich für die IBMPFD sind autosomal-dominant vererbte Mutationen im *Valosin-Containing Protein (VCP)*-Gen, das für das gleichnamige Protein codiert. Das Gen besteht aus einer C-terminalen Domäne und einer N-terminalen Domäne. Die N-terminale CDC48-Domäne ist für die Ubiquitinbindung unerlässlich. Außerdem wurden in dieser Domäne die meisten Mutationen gefunden, die damit eine sogenannte „hot spot“ Region für IBMPFD darstellt.

VCP ist eine AAA ATPase, die in mannigfaltigen zellulären Aktivitäten eine wichtige Rolle spielt. So ist VCP unter anderem an der Kontrolle des Zellzyklus (Rabouille, Kondo et al. 1998) und an der Suppression von Apoptosevorgängen (Meyer, Shorter et al. 2000) beteiligt. Weitere Funktionen des VCP sind die Degradation falsch gefalteter Proteine. Eine Dysfunktion des VCP führt hier zur Bildung von Vakuolen und Einschlusskörpern (Forman, Mackenzie et al. 2006), die man sehr oft in Muskelbiopsien von Patienten mit IBMPFD beobachten kann.

In dieser Arbeit wurden über achtzig Patienten mit Verdacht auf eine hereditäre Einschlusskörpermyopathie klinisch und molekulargenetisch untersucht. Die Analyse klinischer Daten sowie der Vergleich mit in der Literatur beschriebenen molekulargenetischen und klinischen Befunden ermöglichen Hypothesen zur Korrelation von Phänotyp und Genotyp, die die Grundlage für eine verbesserte Diagnostik und Therapie des einzelnen Patienten bilden.

Es wurden bei insgesamt fünf Patienten Mutationen im *GNE*-Gen nachgewiesen, wobei eine Mutation noch nicht in der Literatur vorbeschrieben ist. Bei einem weiteren Patienten wurde eine Mutation im *VCP*-Gen gefunden.

Beim Vergleich der gefundenen Mutationen mit bereits beschriebenen Mutationen fiel auf, dass die Patienten im klinischen Bild viele Parallelen aufwiesen. Der Vergleich zeigt jedoch auch, dass identische Genotypen phänotypisch eine hohe Heterogenität aufweisen können. Die vorliegenden Analysen ermöglichen eine bessere Interpretation der Symptomatik sowie der gezielten Steigerung der Effizienz molekulargenetischer Diagnostik und damit die Möglichkeit einer besseren genetischen Beratung von betroffenen Individuen.

## **2 EINLEITUNG**

Hereditäre Einschlusskörpermyopathien (hereditary inclusion body myopathy; HIBM) bilden eine Gruppe klinisch und genetisch heterogener neuromuskulärer Erkrankungen. Bei einigen Formen ist das defekte Genprodukt bekannt. Sie sind gekennzeichnet durch eine Muskelschwäche und –atrophie, die je nach Subtyp eine vermehrte proximale oder distale Ausprägung aufweisen kann und im jungen Erwachsenenalter auftritt. Ferner besitzen sie ähnliche histopathologische Merkmale im Muskel wie „rimmed vacuoles“ mit intrazytoplasmatischen und intranukleäre Einschlusskörper („filamentous inclusions“).

Bei allen HIBM ist die Serum-Kreatinkinase (CK) normal oder leicht erhöht. Differentialdiagnostisch von den hereditären Einschlusskörpermyopathien ist die sporadische Einschlusskörpermyopathie abzugrenzen (früher: sporadische Einschlusskörpermyositis; sIBM). Diese ist die häufigste Myopathief orm jenseits des 50. Lebensjahres.

### **2.1 Klassifikation**

Hereditäre Einschlusskörpermyopathien werden entweder autosomal-dominant oder autosomal-rezessiv vererbt. Je nach Vererbungsmodus und phänotypischer Ausprägung werden HIBM in verschiedene Subtypen eingeteilt.

Subtyp	Gen	Lokalisation	Vererbungsmodus
HIBM1	Desmin	Chromosom 2q35	aut.-dom.
HIBM2	<i>GNE</i>	Chromosom 9p12-13	aut.-rez.
HIBM3	<i>MyHC IIa</i>	Chromosom 17p13.1	aut.-dom.
IBMPFD	<i>VCP</i>	Chromosom 9p12-13	aut.-dom.

Zu derselben Entität der HIBM2 gehört auch die sogenannte „distal myopathy with rimmed vacuoles“ (DMRV) oder auch nach seinem Erstbeschreiber benannten „Nonaka Myopathy“.

## 2.2 Differentialdiagnosen

Differentialdiagnostisch ist bei hereditären Einschlusskörpermyopathien vor allem die sporadische Einschlusskörpermyopathie in Betracht zu ziehen (s.u.).

Weitere Differentialdiagnosen sind die fazioscapulohumerale Muskeldystrophie (FSHD). Diese autosomal-dominant vererbte Erkrankung manifestiert sich oft vor dem 20. Lebensjahr mit einer Muskelschwäche, die vor allem die faziale Muskulatur und das Schulterblatt betrifft. Die Muskelschwäche ist progredient. 20% der Patienten benötigen im Verlauf einen Rollstuhl. Die Lebenserwartung ist nicht verkürzt.

Aufgrund des asymmetrischen Verteilungsmuster und der Beteiligung von proximalen und distalen Muskelgruppen ist es schon vorgekommen, dass Patienten mit einer Einschlusskörpermyopathie die Fehldiagnose der amyotrophen Lateralsklerose (ALS) erhielten (Kimonis, Mehta et al. 2008). Bei der IBM treten jedoch nicht die für die ALS charakteristischen Faszikulationen auf.

Abzugrenzen sind weiterhin die scapulooperoneale Myopathie (SPM), die sich vor allem im Schultergürtel und in der peronealen Muskulatur bemerkbar macht sowie die Gliedergürtelmuskeldystrophien (LGMD). Dieser Begriff schließt eine große Gruppe von hereditären Muskelerkrankungen ein, deren gemeinsames Merkmal eine progrediente Schwäche der proximalen Schultergürtel- und Beckenmuskulatur ist.

## **2.3 Sporadische Einschlusskörpermyopathie**

Da die sporadische Einschlusskörpermyopathie die wichtigste Differentialdiagnose zu den HIBM darstellt und die häufigste Myopathieform bei über 50jährigen ist, soll sie hier erwähnt werden.

Es handelt sich um eine chronisch progrediente, entzündliche Myopathie, die erstmals 1978 von Carpenter et al. beschrieben wurde, wobei Männer dreimal so oft betroffen sind wie Frauen.

### **2.3.1 Pathomechanismus**

Die Ätiologie der sIBM ist bis heute nicht vollständig geklärt. Einige Autoren gehen davon aus, dass es sich um eine slow virus Infektion handelt (Chou 1986), was sich bislang jedoch nicht verifizieren ließ. Andere wiederum vermuten aufgrund der Assoziation mit MHC-Klasse I Antigenen und DR-Antigenen einen autoimmunpathogenetischen Hintergrund (Garlepp, Laing et al. 1994). Da sich bei der sporadischen Einschlusskörpermyopathie verschiedene Proteine in den zytoplasmatischen Einschlüssen nachweisen lassen können, wie beispielsweise Amyloid-Protein, Apolipoprotein E, Tau- und Prion-Proteine, die auch beim M. Alzheimer vorkommen, liegt die Vermutung nahe, dass es sich um einen neurodegenerativen Prozess handeln könnte (Askanas, Engel et al. 1998).

Neuere Erkenntnisse zeigen eine Überexpression von alphaB-Crystallin in sIBM-Muskel, die bei gesunden Patienten nicht gefunden werden konnte. AlphaB-Crystallin gehört zu den Chaperonproteinen, die in Astrozyten und Mikrogliazellen in der Nähe seniler Alzheimerplaques überexprimiert werden (Banwell and Engel 2000). Dies könnte sowohl die neurodegenerative als auch die entzündliche Komponente der sIBM erklären.

### **2.3.2 Klinik**

Klinisch äußert sich die sIBM durch eine Muskelschwäche, die initial distale Muskelgruppen, wie Fingerbeuger und Fußheber betrifft. Im weiteren Verlauf kommt es zu einer asymmetrischen Muskelatrophie, vor allem der Quadricepsgruppe und der Armflexoren. Schluckstörungen sind keine Seltenheit.

Typisch sind ferner ein spätes Manifestationsalter, eine leicht erhöhte Serum-CK sowie die charakteristische Histologie des Skelettmuskels. Lichtmikroskopisch finden sich „rimmed vacuoles“ sowie lymphozytäre Infiltrate mit Einwanderung von Lymphozyten in nicht-nekrotische Muskelfasern. Elektronenmikroskopisch können typische filamentäre Einschlüsse im Zytoplasma und im Zellkern nachgewiesen werden.

Das wichtigste differentialdiagnostische Kriterium zur Abgrenzung hereditärer Formen war lange Zeit das Fehlen inflammatorischer Infiltrate bei der HIBM. Neuere Studien jedoch berichten von Patienten mit genetisch gesicherter HIBM2 und inflammatorischen Infiltraten (Krause, Schlotter-Weigel et al. 2003), so dass dieses diagnostische Merkmal nicht als einziges Kriterium herangezogen werden sollte.

### **2.3.3 Therapie**

Bis heute ist es nicht gelungen, die sIBM zu heilen. Kortikosteroide und Immunsuppressiva haben sich als unwirksam im langfristigen Krankheitsverlauf erwiesen.

Hochdosierte intravenöse Immunglobuline scheinen eine stabilisierende Wirkung auf den Krankheitsverlauf zu haben. Es konnte gezeigt werden, dass sie eine signifikante Besserung der Dysphagie bewirken (Dalakas 2008). Bei einigen Patienten kam es auch zu einer Besserung bezüglich der Muskelkraft (Dalakas, Sonies et al. 1997). Bei einer kontrollierten Cross-over Studie mit 22 sIBM-Patienten wurde eine leichte Besserung des Krankheitsbildes beobachtet. Außerdem kam es zu einem langsameren Fortschreiten der Erkrankung (Walter, Lochmuller et al. 2000).

Auch die orale Gabe niedrig-dosierter Kortikosteroide kann eine Dysphagie bei der sIBM positiv beeinflussen. Nicht zu vernachlässigen ist der therapeutische Effekt regelmäßiger Physiotherapie, die einen Kraftzuwachs in den weniger atrophierten Muskeln sowie eine allgemeine Stabilisierung der Patienten bewirken kann (Spector et al., 1997).

## **2.4 Hereditäre Einschlusskörpermyopathie Typ 1**

Die autosomal-dominant vererbte HIBM1 ist eine extrem seltene neuromuskuläre Erkrankung. Mittlerweile konnte die verantwortliche Mutation im Desmin-Gen auf Chromosom 2q35 detektiert werden (Goebel and Fardeau 2004).

Der Erkrankungsbeginn liegt zwischen dem 25. und 40. Lebensjahr.

Klinisch äußert sie sich durch einen langsam progredienten Verlauf mit einer frühen im Krankheitsverlauf beginnenden Muskelschwäche des M. quadriceps femoris. Die Serum-CK kann normal oder erhöht sein. In der Muskelbiopsie finden sich rote „rimmed vacuoles“ und multifokale myopathische Veränderungen wie beispielsweise endomysiale Fibrosen oder Variationen in der Faserlänge.

## **2.5 Hereditäre Einschlusskörpermyopathie Typ 3**

Die HIBM3 ist eine extrem seltene Erkrankung, die autosomal-dominant vererbt wird. Hierbei handelt es sich um Mutationen im *MyHC IIa*-Gen. Sie wurde erstmals 1998 von Darin et al. in einer großen schwedischen Familie beschrieben.

Klinisch geht sie mit Gelenkkontrakturen und einer Ophthalmoplegie einher. 75% der Patienten weisen bereits bei der Geburt Kontrakturen auf, die sich in der Kindheit wieder normalisieren. Weitere Charakteristika sind eine eher proximal ausgeprägte

Muskelschwäche und –atrophie, sowie in 60% der Fälle Tremor (Darin, Kyllerman et al. 1998). Im Kindesalter verläuft die HIBM3 nicht progredient. Im Erwachsenenalter, zwischen dem 30. Und 50. Lebensjahr, kommt es jedoch zu einer Abschwächung der Muskelfunktionen und zu den typischen histopathologischen Veränderungen der Einschlusskörpermyopathien.

## **2.6 Hereditäre Einschlusskörpermyopathie Typ 2**

Die autosomal-rezessive Form der HIBM2 wurde erstmals bei Juden aus dem Iran und dem Mittleren Osten als sogenannte „Quadriceps sparing myopathy“ beschrieben (Argov and Yarom 1984), später dann auch weltweit. Sie ist insgesamt eine sehr seltene Erkrankung. Die Prävalenz bei Juden persischer Herkunft beträgt 1:500 (Argov, Tiram et al. 1997).

Parallel dazu beschrieb Nonaka et al. bei japanischen Patienten die distale Myopathie mit rimmed vacuoles (DRMV) bzw. die Nonaka-Myopathie (Nonaka, Murakami et al. 1998).

Beide Erkrankungen lassen sich weder phänotypisch noch genotypisch voneinander unterscheiden. Sie werden autosomal-rezessiv vererbt und sind mit Mutationen im UDP-*N*-Acetylglucosamin-2-Epimerase / *N*-Acetylmannosamin-Kinase (*GNE*)-Gen assoziiert.

### **2.6.1 Pathologie**

Wie bei fast allen hereditären Einschlusskörpermyopathien lassen sich auch bei der HIBM2 „rimmed vacuoles“ mit zytoplasmatischen und intranukleären filamentösen Einschlüssen mit einem Durchmesser von circa 14 – 20 nm finden.

Die „rimmed vacuoles“ enthalten verschiedene Proteine, wie beispielsweise Amyloid-beta, phosphoryliertes Tau-Protein, ApoE und Ubiquitin (Nonaka, Sunohara et al. 1985).

## 2.6.2 Klinik

Das Manifestationsalter der HIBM2 liegt durchschnittlich bei 26 Jahren (zwischen dem 15. und 40. Lebensjahr).

Die Erkrankung ist durch einen langsamen progredienten Verlauf distaler und proximaler Muskelschwäche gekennzeichnet und zeigt ein sehr variables klinisches Bild.

Die Muskelschwäche beginnt oftmals in den distalen Muskelgruppen der unteren Extremitäten, hier ist vor allem der M. tibialis anterior betroffen. Daher kann das erste Symptom oft ein verändertes Gangbild sein, das als Steppergang bezeichnet wird. Die Besonderheit dieser Form der Einschlusskörpermyopathie liegt darin, dass der M. quadriceps femoris ausgespart wird oder aber sehr spät im Verlauf der Erkrankung beteiligt ist, obwohl die übrige Muskulatur der unteren Extremität zuerst und am schwersten beeinträchtigt ist (Argov and Yarom 1984).

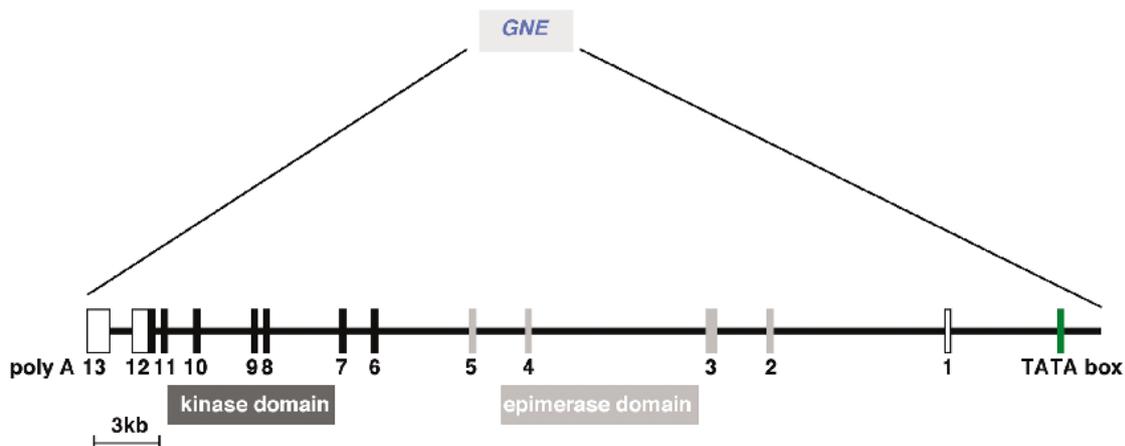
Eine Muskelschwäche der Dorsalflexoren am Fußgelenk und der Extensoren der Zehen können weitere Symptome zu Beginn der Erkrankung sein. Auch eine Finger- und Handmuskelschwäche können auftreten, die jedoch oft nicht so stark ausgeprägt ist wie die Muskelschwäche an den unteren Extremitäten.

Typischerweise schreitet die Muskelschwäche vom anterioren Kompartiment des Beins über die Wade zu den proximalen Extremitäten bis hin zu den Flexoren des Nackens voran, wo dann auch die Schultergürtelmuskulatur miteingeschlossen wird. Nach 10 – 15 Jahren kommt es zu einer generalisierten Muskelschwäche, wobei die Augen-, Gesichts- und Atemhilfsmuskulatur ausgespart werden. Einige Autoren schließen eine kardiale Mitbeteiligung mit konsekutivem plötzlichem Herztod aufgrund von Arrhythmien nicht aus (Nishino, Malicdan et al. 2005). Die Patienten werden durchschnittlich zwölf Jahre nach Ausbruch der Erkrankung rollstuhlpflichtig.

### 2.6.3 Genetik

Die autosomal-rezessive Form der Einschlusskörpermyopathie (HIBM2) wird durch Mutationen im UDP-*N*-Acetylglucosamin-2-Epimerase / *N*-Acetylmannosamin-Kinase (*GNE*)-Gen verursacht, welches für das gleichnamige Enzym kodiert, das das Schlüsselenzym des Sialinsäurebiosynthesewegs darstellt. Es gehört zu einer Gruppe von etwa vierzig Genen, die sowohl bei Wirbeltieren als auch Bakterien vorkommen und ein Beispiel für einen möglichen horizontalen Gentransfer darstellen (Salzberg, Delcher et al. 1998).

Das Gen ist auf Chromosom 9p12 – p13 lokalisiert und umfasst ein genomisches Intervall von 700 kb (Eisenberg, Hochner et al. 2001). Das *GNE*-Gen besitzt eine N-terminale Epimerasedomäne (Exons 2–5) und eine C-terminale Kinasedomäne (Exons 6 – 12). Exon 1 und 13 sind nicht codierend (Abb. 1).



#### **Abb. 1 Genomische Organisation des *GNE*-Gens**

Dargestellt sind die genomischen Segmente, die für die Epimerasedomäne (grau) und die Kinasedomäne (schwarz) des Proteins codieren. Die ausgefüllten Kästchen stellen codierende Exons dar, die leeren Kästchen (Exon 1 und 13) nicht codierende Exons. Die TATA Box befindet sich im Abstand von ca. 10 kb aufwärts des Exon 1 (Eisenberg, Avidan et al. 2001).

Autosomal-dominant vererbte Mutationen in der allosterischen Region der Epimerasedomäne (Codon 263–266) des *GNE*-Gens verursachen das Krankheitsbild der Sialurie. Es wurde bisher über drei autosomal-dominante Missense-Mutationen im allosterischen Zentrum der Epimerasedomäne (Codon 263 – 266) berichtet, die zu diesem Krankheitsbild führen. Das allosterische Zentrum ist essentiell für die Aufrechterhaltung der Rückkopplungshemmung oder Endprodukthemmung des Sialinsäurebiosynthesewegs.

Die Sialurie ist eine äußerst seltene angeborene Stoffwechselerkrankung, bei der es durch den Verlust der Feedback-Hemmung des Enzyms zu einer zytoplasmatischen Akkumulation von Sialinsäure kommt, sowie zu dessen vermehrter Ausscheidung im Urin. Bei der HIBM2 kommt es nicht zu Symptomen der Sialurie. Es fanden sich keine Hinweise auf eine defekte Endprodukthemmung in der Sialinsäurebiosynthese bei HIBM2-Patienten.

Im Gegensatz zur Sialurie fanden sich die Mutationen, die zur HIBM2 führen (compound heterozygote oder homozygote Missense-Mutationen), verteilt über die gesamte Sequenz der *UDP-GlcNAc-2-Epimerase / ManNAc-Kinase (GNE)* und können sich auf beide funktionellen Domänen auswirken.

Es sind sechzig verschiedene Mutationen bekannt, wobei die häufigste die M712T Mutation ist, die in einer jüdischen Volksgruppe aus dem Iran und Mittleren Osten identifiziert und als „founder mutation“ in dieser Population gesichert wurde (Argov, Eisenberg et al. 2003).

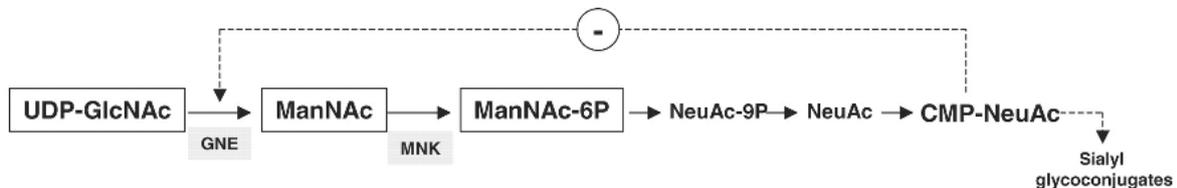
#### **2.6.4 Pathomechanismus**

UDP-N-Acetylglucosamin-2-Epimerase / N-Acetylmannosamin-Kinase (GNE) ist ein bifunktionales Enzym, das für die frühe embryonale Entwicklung von essentieller Bedeutung ist. Das Protein ist im Zytosol, im Golgi-Apparat und im Nukleus lokalisiert (Krause, Hinderlich et al. 2005). Es ist das Schlüsselenzym der Sialinsäurebiosynthese und katalysiert im Zytosol die ersten zwei geschwindigkeitsbestimmenden Schritte dieses Stoffwechselwegs.

Der erste Schritt wird von der N-terminalen Epimerasedomäne katalysiert. Der zweite Schritt ist eine ATP-abhängige Phosphorylierung, die von der C-terminalen Domäne

katalysiert wird. Über weitere Zwischenschritte entsteht dann *N*-Acetylneuraminsäure, die am häufigsten vorkommende Sialinsäure in eukaryontischen Zellen (Sparks, Ciccone et al. 2005) (Abb. 2).

Im Zellkern wird sie in ihre aktive Form umgewandelt und gelangt über einen Transporter in den Golgi-Apparat. Hier kommt es mittels Sialyltransferasen zur Sialylierung von Glykokonjugaten (Kean, Munster-Kuhnel et al. 2004).



### **Abb. 2 GNE-Funktion in den ersten zwei Schritten der CMP-NeuAc Biosynthese**

Im ersten Schritt wird UDP-N-Acetylglucosamin von der Epimerasedomäne in ManNAc umgewandelt. Dieser geschwindigkeitsbestimmende Schritt wird nach dem Prinzip der Rückkopplungshemmung durch das Endprodukt CMP-NeuAc kontrolliert. Durch die Kinasedomäne wird ManNAc in ManNAc-6P umgewandelt. Über einige Zwischenschritte wird aus ManNAc-6P CMP-NeuAc. CM-NeuAc wird im Golgi-Apparat zur Sialylierung von Glykokonjugaten verwendet (Sparks, Ciccone et al. 2005).

Sialinsäuren sind an der distalen Seite von Glykanketten lokalisiert und üben verschiedenste Funktionen aus. Sie verleihen Glykoproteinen an der Zellmatrix die notwendige Stabilität (Rens-Domiano and Reisine 1991) und sind an der Zelladhäsion beteiligt (Edelman and Crossin 1991). Ferner spielen sie eine wichtige Rolle im Verhalten der Tumorigenität und Metastasierung maligner Zellen (Dennis and Laferte 1985) und bei Adhäsionsvorgängen von Bakterien und Viren (Matrosovich and Klenk 2003).

Obwohl der Mechanismus der Sialinsäurebiosynthese weitgehend aufgeklärt ist, ist wenig über die Pathophysiologie bei der HIBM2 bekannt. Bei Mutationen im *GNE*-Gen kommt es zu einer reduzierten enzymatischen Aktivität des gleichnamigen Enzyms. Aktivitätsmessungen bei *in vitro* exprimierten *GNE*-Mutanten haben gezeigt, dass es zu einer reduzierten Aktivität in der mutierten Domäne kommt, wobei die Aktivität der anderen Domäne ebenfalls beeinträchtigt wird (Penner, Mantey et al. 2006). Einige

Autoren beschreiben bei Patienten, die beide Mutationen in der Epimerasedomäne haben, eine Hyposialylierung von Glykoproteinen im Skelettmuskel, die aufgrund von falsch gefalteten Glykoproteinen zu einer Dysfunktion des Skelettmuskels beitragen könnte (Saito, Tomimitsu et al. 2004).

Andere wiederum kommen zu dem Schluss, dass es nur zu einer verminderten Sialylierung in Muskelzellen kommt, wenn die Epimeraseaktivität sehr stark reduziert ist (Salama, Hinderlich et al. 2005). Es bedarf sicherlich weiterer Studien, um Klarheit in den bisher unbekanntem molekularen Pathomechanismus der HIBM2 zu bringen.

## **2.7 IBMPFD**

Die Symptomen-Trias aus Einschlusskörpermyopathie, M. Paget und frontotemporaler Demenz (IBMPFD) charakterisiert eine sehr seltene autosomal-dominant vererbte Erkrankung. Die Einschlusskörpermyopathie (IBM) äußert sich klinisch als progredient verlaufende distale Myopathie und ähnelt dem klinischen Bild der Gliedergürtelmuskeldystrophie, insbesondere der Schultergürteldystrophie. Fakultativ kann es zu einem früh auftretenden M. Paget des Knochens und / oder einer vorzeitigen frontotemporalen Demenz kommen.

### **2.7.1 Pathologie**

Neben den typischen morphologischen Veränderungen der hereditären Einschlusskörpermyopathien mit „rimmed vacuoles“ und Einschlusskörpern, lassen sich bei Patienten mit IBMPFD im Skelettmuskel degenerative Veränderungen, wie eine vergrößerte Faserlänge und eine Atrophie von Typ I- und Typ II-Fasern finden. Ferner können Fasern mit zytoplasmatischen VCP- und Ubiquitin-positiven Proteinaggregaten nachgewiesen werden (Schroder, Watts et al. 2005).

Im Gegensatz dazu zeigt die Neuropathologie eine Kolokalisation von VCP und Ubiquitin im Nukleus von Neuronenzellen, die im Zytoplasma jedoch gar nicht oder nur gering nachzuweisen ist (Schroder, Watts et al. 2005). Diese Aggregate sind aber keinesfalls typisch für die IBMPFD, da sie auch bei vielen anderen neurodegenerativen Erkrankungen wie dem M. Parkinson, der amyotrophen Lateralsklerose (ALS) und der Chorea Huntington vorkommen.

Histopathologisch wird ein Verlust kortikaler Neurone mit einer starken Astrogliose beobachtet, die vor allem in der zerebralen und zerebellären weißen Substanz auftritt (Schroder, Watts et al. 2005). Die Makroskopie zeigt ein erweitertes Ventrikelsystem. Mikroabzesse mit kleinen zerebralen Ödemen können auftreten (Kovach, Waggoner et al. 2001).

Einige Autoren berichten, dass es durch eine Blockade von VCP zu Leberabnormalitäten kommt, die mit Zytolyse, Cholestase und Steatose sowie mit einer nichtspezifischen Fibrose einhergehen (Guyant-Marechal, Laquerriere et al. 2006).

Auf pathologischer Ebene lässt sich die frontotemporale Demenz bei der IBMPFD dadurch charakterisieren, dass der Okzipitallappen sehr stark betroffen ist und der Gyrus dentatus fast vollständig ausgespart wird. Zytoplasmatische Einschlüsse kommen in einer sehr niedrigen Frequenz bei der frontotemporalen Demenz vor. Für die sporadische Einschlusskörpermyopathie ist eine Demenz sehr untypisch.

### **2.7.2 Klinik**

Das Manifestationsalter der IBMPFD liegt durchschnittlich im 42. Lebensjahr. Etwa zehn Jahre später kann zu den Symptomen der Einschlusskörpermyopathie und des M. Paget eine frontotemporale Demenz hinzukommen (Kimonis, Mehta et al. 2008).

Beim M. Paget handelt es sich um eine lokalisiert auftretende Osteopathie, die normalerweise nach dem 60. Lebensjahr auftritt. Es kommt zu einem exzessiven Knochenumbau durch eine erhöhte Aktivität der Osteoblasten, die zu abnormen Knochenstrukturen führt, was letzten Endes Knochenfrakturen und Deformationen zu Folge hat (Hamdy 1995). Aufgrund der erhöhten Aktivitäten von Osteoblasten und Osteoklasten kommt es zu einer Erhöhung der alkalischen Phosphatase (AP) im Serum und zu einer Erhöhung des Hydroxyprolin im Urin. Außerdem wird Pyridinolin mit dem

Urin ausgeschieden, das als Markersubstanz Bedeutung hat (Kimonis, Kovach et al. 2000). Neben den morphologischen Veränderungen des Knochens haben Patienten mit M. Paget vor allem Schmerzen im Stütz- und Bewegungsapparat. Typisch bei Patienten mit IBMPFD ist die Verteilung im Becken, im Schädel und der Wirbelsäule.

Die Klinik der frontotemporalen Demenz korreliert mit Funktionen des Frontal- und Temporallappens. So kann sie sich durch eine verstärkte Agitation oder Apathie äußern. Es können Persönlichkeitsveränderungen auftreten.

Einige Patienten leiden unter visuellen oder akustischen Halluzinationen. Häufig sind auch Dysfunktionen in der Sprache zu beobachten. Die Merkfähigkeit bleibt relativ erhalten (Kovach, Waggoner et al. 2001).

Die Einschlusskörpermyopathie bei Patienten mit IBMPFD äußert sich durch eine proximale Muskelschwäche in den Extremitäten. Viele Patienten haben Schwierigkeiten, die Arme über den Kopf zu heben oder Treppen zu steigen. Bei einigen von ihnen lässt sich eine Scapula alata oder eine Lumballordose feststellen.

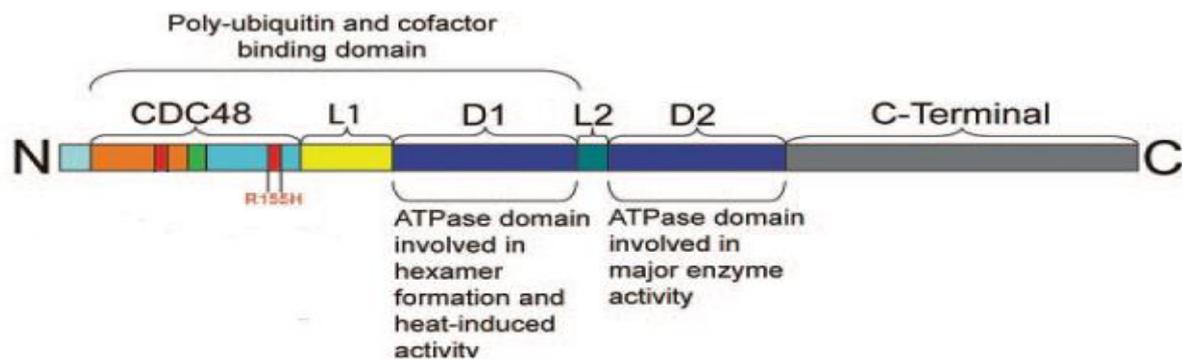
Patienten mit IBMPFD versterben durchschnittlich um das 60. Lebensjahr an respiratorischem oder kardialen Versagen (Tucker, Hubbard et al. 1982).

### **2.7.3 Genetik**

Mutationen im *Valosin-containing Protein (VCP)*-Gen, das sich auf Chromosom 9p12–13 befindet, verursachen eine autosomal-dominante Form der Einschlusskörpermyopathie, die mit einem M. Paget und einer frontotemporalen Demenz assoziiert ist (Watts, Wymer et al. 2004).

Das Gen besteht aus insgesamt 17 Exons, wobei Teile des ersten und des 17. Exons nicht translatiert werden. Die N-terminale Domäne besteht aus den ersten zwölf Exons und beinhaltet die CDC48-Domäne, die eine wichtige Rolle in der Ubiquitinbindung einnimmt. Die C-terminale Domäne enthält die letzten fünf Exons.

Im Gegensatz zu der HIBM2 gibt es bei der IBMPFD eine „hot spot“ Region, in der sich die Mehrzahl der bisher gefundenen pathologischen Aminosäureveränderungen befinden. Hierbei handelt es sich u. a. um das Codon 155 im Exon 5 (Viassolo, Previtali et al. 2008). Dieses Exon ist Teil der N-terminalen CDC48 Domäne, die an poly-Ubiquitin und Kofaktoren bindet (Abb. 3).



### Abb. 3 Struktur des VCP Proteins

Die CDC48-Domäne verbindet die D1 AAA-ATPase-Domäne (Aminosäuren 208-459; dunkelblau) mittels einer Verbindungsregion L1 (Aminosäuren 187-208; gelb). Die zweite Verbindungsregion L2 ist grün dargestellt, die zweite AAA-ATPase-Domäne D2 (Aminosäuren 481-761) blau und die C-terminale Domäne (Aminosäuren 762-806) grau. Die „hot spot“ Region um R155H ist rot markiert (Hubbers, Clemen et al. 2007).

### 2.7.4 Pathomechanismus

VCP gehört zur AAA-ATPase Superfamilie, die eine wichtige Rolle in verschiedenen zellulären Aktivitäten einnimmt. VCP ist unter anderem an der Kontrolle des Zellzyklus (Rabouille, Kondo et al. 1998) und an der Suppression von Apoptosevorgänge (Meyer, Shorter et al. 2000) beteiligt. Ferner spielt es eine wichtige Rolle in der Retrotranslokation falsch gefalteter Proteine aus dem endoplasmatischen Retikulum (ER) (Meyer, Shorter et al. 2000) sowie in der Degradation zytosolischer Proteine, die über das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) reguliert wird (Forman, Mackenzie et al. 2006).

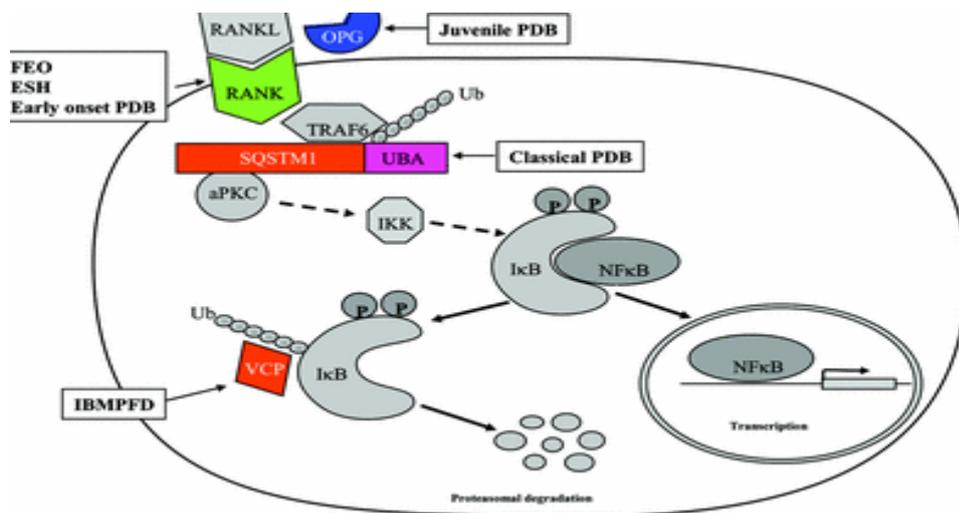
VCP bildet ein Homohexamer, das verschiedene Proteine, die mit dem UPS assoziiert sind, über die N-terminale Domäne bindet. Dieser Komplex wiederum bindet an Polyubiquitinketten, so dass ubiquitinierte Proteine aus ihrer Bindung an Kofaktoren gelöst werden. Dieser Vorgang erleichtert dann den Transport zum UPS (Forman, Mackenzie et al. 2006).

Eine andere Funktion von VCP ist die im endoplasmatischen Retikulum stattfindende Degradation falsch gefalteter Proteine. Studien hierzu konnten zeigen, dass eine Dysfunktion von VCP zur Bildung von Vakuolen und Einschlusskörper führt (Forman, Mackenzie et al. 2006).

Die meisten Missense-Mutationen im *VCP-Gen* führen zu einem Aminosäureaustausch in der N-terminalen CDC48-Domäne des VCP-Proteins. Diese Domäne ist für die Bindung an Ubiquitin unerlässlich, so dass davon ausgegangen werden kann, dass das mutierte VCP-Protein mit der ubiquitinabhängigen Retrotranslokation und Degradation interferiert, was schließlich zu einer abnormen Proteinaggregation im Nukleus und Zytoplasma postmitotischer Zellen führt (Schroder, Watts et al. 2005), sowie zu den typischen Vakuolen und Einschlusskörpern.

Dieser Pathomechanismus zeigt viele Parallelen zu anderen neurodegenerativen Erkrankungen. So ist schon seit längerem bekannt, dass Alterationen in der UPS Funktion auch beim M. Parkinson, bei der Alzheimer Erkrankung und bei der amyotrophen Lateralsklerose (ALS) auftreten (Ciechanover and Brundin 2003), was sehr gut mit der Pathologie neurodegenerativer Erkrankungen und der IBMPFD korreliert.

Erwähnenswert scheint noch, dass Mutationen im Sequestosome-1 (*SQSTM1*)-Gen eine autosomal-dominante Form des M. Paget verursachen. Sowohl *SQSTM1* als auch *VCP* sind an der Regulation der NF- $\kappa$ B-Funktion beteiligt, so dass man auch hier davon ausgehen kann, dass beide Mutationen ähnliche Defekte in UPS-abhängigen Signalwegen verursachen (Geetha and Wooten 2002) (Abb. 4).



**Abb. 4 Aktivierung der NF-kappa-B Signalkaskade durch Bindung von RANKL an RANK**

SQSTM1 wirkt als Stützprotein, das den RANK/TRAF6 Komplex mit dem aPKC Komplex verbindet. Das aktivierte IKK phosphoryliert Ikb. Durch VCP wird Ikb im UPS degradiert. Dadurch kann NF-kappa-B dissoziieren und damit in den Nucleus gelangen, wo die entsprechenden Gene aktiviert werden. OPG, der Rezeptor für RANKL inhibiert die Osteoklastogenese. Mutationen im RANK verursachen FEO, ESH und PDB. Mutationen im VCP verursachen IBMPFD (Daroszewska and Ralston 2005).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass diese Pathomechanismen zu einer veränderten Struktur des endoplasmatischen Retikulums führen, die mit Vakuolisierungen im Zytoplasma einhergehen können. Ferner kommt es zu einer Akkumulation ubiquitiniertes Proteine, die keine Aggresome bilden, sondern dispers verteilte Aggregate im Zytoplasma. Veränderungen der proteasomalen Funktion finden sich nicht. Die Apoptose und die Mitose, bei denen VCP auch eine entscheidende Rolle spielt, werden nicht beeinflusst (Guyant-Marechal, Laquerriere et al. 2006).

### 3 ZIELSETZUNG

Hauptziel dieser Arbeit ist die klinische und molekulargenetische Charakterisierung hereditärer Einschlusskörpermyopathien.

Im Mittelpunkt stehen hier vor allem die HIBM2 und die IBMPFD, die durch Mutationen im *GNE*-Gen bzw. im *VCP*-Gen verursacht werden.

*GNE* kodiert für das gleichnamige Enzym, das eine wichtige Schlüsselfunktion in der Sialinsäurebiosynthese einnimmt; *VCP* hingegen hat mannigfaltige Funktionen. So nimmt es beispielsweise an der Kontrolle des Zellzyklus teil und ist am Proteinabbau über das UPS beteiligt.

Es wurden mittlerweile sechzig Mutationen im *GNE*-Gen gefunden, die die HIBM2 verursachen. Es ist jedoch nicht aufgeklärt, welche Rolle die verschiedenen Mutationen in der Pathogenese der HIBM2 einnehmen. Verschiedene Studien konnten lediglich zeigen, dass es zu einer Reduktion der enzymatischen Aktivität von *GNE* kommt.

Auch die Pathogenese der IBMPFD ist bei weitem noch nicht aufgeklärt. Im Gegensatz zu der HIBM2 gibt es jedoch eine „hot spot“ Region, wo sich die meisten bisher gefundenen Mutationen im *VCP*-Gen befinden. Hierbei handelt es sich um das Codon 155 im Exon 5. Weitere Exons, in denen signifikant gehäuft Mutationen gefunden wurden, waren Exon 3 und Exon 6.

Ein weiteres Problem liegt in der Diagnose dieser Krankheitsentitäten. Beide weisen ein sehr breites heterogenes klinisches Bild auf und nehmen bei jedem Patienten einen individuellen Krankheitsverlauf ein. Daher ist die Phänotyp-Genotyp-Korrelation erschwert.

Aufgrund des großen Spektrums an Mutationen in diesen beiden Genen, stellt sich die Aufgabe einerseits neue Typen von Mutationen zu identifizieren, andererseits bekannte Mutationen in Bezug auf ihrer Pathogenität und Auswirkung auf den Phänotyp genauer zu analysieren. Dies könnte anhand von möglichst vielen gesicherten Mutationen, die zu HIBM2 bzw. IBMPFD führen, geschehen. Dadurch könnten dann genauere Aussagen über Häufigkeit und Verteilung der Mutationen in bestimmten Ethnien gemacht werden.

Weiterhin ist die Abgrenzung der einzelnen Einschlusskörpermyopathien zu anderen neuromuskulären Erkrankungen aufgrund des Phänotyps oder auch laborchemischer Parameter nicht sicher möglich. Insofern könnte sich der Vergleich genetischer und klinischer Daten als hilfreich erweisen und somit beitragen kausalpathogenetisch einen Zusammenhang zwischen Genetik, Pathophysiologie und Klinik herzustellen. Nicht zuletzt könnten diese Ergebnisse einen Beitrag zu einer sicheren Diagnostik und zu einer besseren genetischen Beratung des einzelnen Patienten beitragen.

## 4 MATERIAL UND METHODEN

### 4.1 Patienten und Untersuchungsmaterial

Es wurden insgesamt 80 Patienten mit idiopathischer Einschlusskörpermyopathie untersucht. Bei 40 Patienten wurden Mutationen oder genetische Veränderungen im *GNE-Gen* und bei weiteren 40 Patienten im *VCP-Gen* untersucht.

Die Rekrutierung der Patienten erfolgte nach ausführlicher klinischer Untersuchung, elektrophysiologischer Diagnostik und invasiver Diagnostik mittels Muskelbiopsie durch Herrn Prof. Dr. H. Lochmüller, Frau Priv.-Doz. Dr. med. M. Walter und Frau Dr. med. Dr. phil. S. Krause am Friedrich-Baur-Institut der LMU - München.

Zusätzliches Patientenmaterial (EDTA-Vollblut, Muskelgewebe, genomische DNA) wurde von verschiedenen Kliniken aus Deutschland und aus dem Ausland zur molekulargenetischen Untersuchung eingesandt. Zusätzlich zu den zu untersuchenden Patienten wurde auch Material in Form von EDTA-Vollblut oder genomischer DNA von Angehörigen in die weiteren Untersuchungen einbezogen, sofern bei den untersuchten Patienten eine Mutation gefunden wurde. DNA aus EDTA-Vollblut von gesunden freiwilligen Personen diente als Kontrolle.

Alle durchgeführten Untersuchungen erfolgten nach Aufklärung und mit schriftlichem Einverständnis der Patienten bzw. deren Familienangehörigen. Ein positives Votum der Ethikkommission der LMU - München liegt zu den durchgeführten Untersuchungen vor (Projektnummer 084100).

## 4.2 Chemikalien

Alle benutzten Chemikalien entsprachen höchsten Reinheitsanforderungen und stammen soweit nicht anders erwähnt von Sigma (München, Deutschland).

## 4.3 Molekulargenetische Methoden

### 4.3.1 DNA Extraktion

Die Extraktion genomischer DNA erfolgte aus venösem EDTA-Vollblut, das peripher entnommen wurde mittels Promega Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega, Mannheim, Deutschland), entsprechend den Angaben des Herstellers.

### 4.3.2 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Bei den zu untersuchenden Genen (*VCP*, *GNE*) wurden die gesamten kodierenden Regionen, sowie flankierende intronische Bereiche und zum Teil auch Promoterregionen sowie 3'-untranslatierte Bereiche amplifiziert.

Beim *GNE*-Gen waren dies die Exons 1 bis 12. Beim *VCP*-Gen waren dies vor allem die Exons 3, 5 und 6 als sogenannte „hot spot“ Regionen; bei sehr typischem klinischen Befund oder charakteristischer Familienanamnese mit der klinischen Trias aus Einschlusskörpermyopathie, M. Paget und frontotemporaler Demenz wurden auch die restlichen Exons 1 bis 17 untersucht.

Durch die PCR, die 1990 von Mullis entwickelt worden war, konnten somit die definierten genomischen DNA-Fragmente exponentiell *in vitro* amplifiziert werden (Mullis 1990).

### 4.3.2.1 Reaktionsbedingungen

Ein typischer PCR-Ansatz enthält in 50 µl Reaktionsvolumen:

- 5 µl 10x Reaktionspuffer (ThermoPol Buffer; New England Biolabs (NEB, Frankfurt, Deutschland)
- 5 µl Dimethylsulfoxid (DMSO)
- 5 µl dNTP-Mix (2,5 mM, Boehringer Mannheim oder MBI Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland): 0,25 mM je dNTP
- 1 µl Taq DNA-Polymerase (Boehringer Mannheim)
- 1 µl sense Primer (50 pmol)
- 1 µl antisense Primer (50 pmol)
- 2 µl genomische DNA
- 30 µl H<sub>2</sub>O ad 50 µl Gesamtvolumen

Die Amplifikationseffizienz der PCR wurde teilweise durch Zugabe von Mg<sup>2+</sup> in unterschiedlicher Konzentration optimiert. Die PCR wurde in einem Thermocycler (Mastercycler personal, Eppendorf) durchgeführt.

Ein typisches PCR Programm zur Amplifikation des *GNE*-Gens umfasst:

1. Denaturierung der DNA	95°C: 60 sec	
2a. Aufschmelzen der DNA-Doppelstränge	94°C: 15 sec	40 Zyklen
2b. Anlagern der Primer (Annealing)	55°C: 60 sec	
2c. Synthese des DNA-Doppelstranges (Extension)	72°C: 60 sec	
3. abschließende Extension	72°C: 7 min	

Ein typisches PCR-Programm zur Amplifikation des *VCP*-Gens umfasst:

1. Denaturierung der DNA	95°C: 60 sec	
2a. Aufschmelzen der DNA-Doppelstränge	94°C: 15 sec	40 Zyklen
2b. Anlagern der Primer (Annealing)	59°C: 60 sec	
2c. Synthese des DNA-Doppelstranges (Extension)	72°C: 60 sec	
3. abschließende Extension	72°C: 7 min	

#### 4.3.2.2 PCR-Primer

Die verwendeten Primer wurden entworfen, basierend auf in der GenBank-Datenbank veröffentlichten Sequenzen der zu untersuchenden Gene ([www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi) bzw. Acc. no. für *GNE* AL158830 und für *VCP* AC004472), mit Hilfe des Programms Amplify (B. Engels, 1992, University of Wisconsin, Madison, USA) optimiert und durch die Abteilung von Herrn Dr. G. Arnold, Genzentrum, Ludwig-Maximilians-Universität-München synthetisiert.

#### 4.3.3 Aufreinigung der PCR-Produkte in der Agarose-Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese erlaubt, unterschiedliche DNA-Fragmente entsprechend ihrer Größe und Ladung im elektrischen Feld zu trennen.

Zur elektrophoretischen Auftrennung der in der PCR synthetisierten PCR-Produkte bzw. vor dem Einsatz der PCR-Produkte in der Sequenzanalyse wurde ein 2% Agarose-Gel in TAE-Puffer mit Ethidiumbromid (0,5 µl/ml, Stammlösung 10 mg/ml) verwendet. Dabei wurden 4 g Agarose (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) in einen Erlenmeyerkolben eingewogen und mit 200 ml TAE-Puffer aufgefüllt, so dass sich die gewünschte Konzentration von 2% ergab.

Der 10xTAE-Elektrophoresepuffer (pH 8,5) setzt sich wie folgt zusammen:

- 0,4 M Tris-HCl (Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland)
- 10 mM Na<sub>2</sub>EDTA (Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland)
- 0,2 M Essigsäure (Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland)

Nachdem die Lösung in einer Mikrowelle solange erhitzt worden ist, bis sich die Agarose schlierenfrei auflöste, wurden 10 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml) hinzugefügt. Anschließend wurde die Agarose in eine Gelkammer, die mit einem Taschenkamm versehen war, eingegossen. Nach Aushärten des Gels wurde der Taschenkamm entfernt und das Gel in die Elektrophoreseapparatur, welche mit 1xTAE-Puffer gefüllt war, eingetaucht. Die PCR-Produkte wurden mit 1/10 Volumen Ladepuffer (10 mM Tris-HCl (pH 7,6), 0,03% Bromphenol-Blau, 0,03% Xylencyanol, 60 mM EDTA, 60% Glycerin) versetzt und in die Tasche hineinpipetiert. Eine Tasche wurde jeweils mit einem Größenmarker (10 µl 100 bp Leiter, MBI Fermentas, Leon-Rot, Deutschland) gefüllt, der das Ablesen der Fragmentlänge erlaubt.

Die gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Fragmente erfolgte bei 120 V über ungefähr 45 Minuten.

#### **4.3.4 Gelextraktion**

Die PCR-Fragmente bzw. die DNA wurden zunächst aus dem Gel unter UV-Lichtkontrolle mit einem Skalpell herausgeschnitten. Danach erfolgte die Gelextraktion mit QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) oder Nucleic Acid Purification Kit (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) gemäß den Angaben des Herstellers.

#### 4.3.5 Sequenzanalyse

Die in der PCR synthetisierten PCR-Produkte wurden nach Aufreinigung zunächst im kodierenden Strang sequenziert. Bei einem Aminosäureaustausch wurde zur Kontrolle auch der Gegenstrang sequenziert. Die Sequenzierung erfolgte durch die Firma Medigenomix in Martinsried, München, Deutschland. Die Firma Medigenomix verwendet für die Sequenzierung die Sequenziergeräte der Firma Applied Biosystems (Modelle Prism XL96 bzw. 377) und fluoreszenzmarkierte Didesoxy-Terminatoren. Dazu wurden 96-well-Platten eingesandt mit jeweils:

- 5 µl extrahierter DNA
- 4 µl H<sub>2</sub>O
- 1 µl des entsprechenden Primers (10 pmol)

Die Sequenzen wurden dann mit den entsprechenden Datenbanksequenzen (GenBank-Zugangsnummer für *VCP* gi 2984582 und für *GNE* gi 11121380) online über [www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) verglichen und auf Mutationen untersucht.

#### **4.4 Restriktionsverdau und Restriktionsfragmentlängen-Polymorphismus-Analyse**

Zur Analyse unbekannter, bislang nicht vorbeschriebener Sequenzveränderungen wurden Restriktionsverdau durchgeföhrt. Restriktionsenzyme schneiden DNA im Bereich spezifischer Erkennungssequenzen. Ist die Sequenz jedoch verändert, sei es durch eine Mutation oder einen Polymorphismus, kann diese Schnittstelle zerstört sein oder eine neue Schnittstelle entstehen.

Das zu testende PCR-Produkt wurde dazu mit 3 µl 10x Puffer und 1 µl des jeweiligen Restriktionsenzym (10-20 Units; verwendet wurden Enzyme der Firmen MBI Fermentas, St. Leon-Rot oder New England Biolabs, Frankfurt) versetzt und mit destilliertem Wasser auf ein Endvolumen von 30 µl aufgefüllt. Der Ansatz wurde dann bei der für das jeweilige Enzym optimalen Reaktionstemperatur für 3-12 Stunden inkubiert.

In der Agarose-Gelelektrophorese konnten anschließend das Wildtyp-Allel und das veränderte Allel anhand der Länge der Restriktionsfragmente unterschieden werden.

Hierfür wurde für eine Patientin mit einer noch nicht beschriebenen *GNE*-Mutation das Restriktionsenzym *A1a* II (New England Biolabs GmbH) ausgewählt. Da die Mutation im Bereich der Erkennungssequenz des Restriktionsenzym lag, wurde das PCR-Fragment geschnitten. Daraufhin wurden 50 Normalkontrollen durchgeföhrt, wobei die Wildtyp-Sequenz vom Restriktionsenzym nicht geschnitten wurde.

## 5 ERGEBNISSE

In dieser Arbeit wurden insgesamt 80 klinisch und muskelbiologisch gut charakterisierte Patienten, bei denen der Verdacht auf eine HIBM 2 oder einer IBMPFD bestand, auf Mutationen im *GNE*-Gen bzw. im *VCP*-Gen untersucht.

Bei einem Patienten konnten Mutationen im *VCP*-Gen als Pathogenitätsfaktor identifiziert werden, bei weiteren fünf Patienten wurden Mutationen im *GNE*-Gen gefunden.

### 5.1 Analyse des UDP-*N*-Acetylglucosamin-2-Epimerase / *N*-Acetylmannosamin-Kinase (*GNE*) - Gens

Bei 45 Patienten wurde das *GNE*-Gen auf Mutationen untersucht. Das Gen umfasst zwölf Exons, wobei das Exon 1 nicht translatiert wird.

Bei fünf Patienten konnten Missense-Mutationen als Ursache für hereditäre Einschlusskörpermyopathien gefunden werden.

Unter diesen fünf Patienten sind zwei Roma, eine Schottin und zwei italienische Geschwister.

Die Patienten aus Schottland und Italien wiesen compound heterozygote Mutationen auf. Die Roma-Patienten hatten eine homozygote Mutation im Exon 10, die als „Gypsy-Mutation“ bezeichnet wird, da sie in dieser Volksgruppe häufig nachgewiesen wird (Kalaydjieva, Lochmuller et al. 2005).

## **5.1.1 Patient A: Mutationen D378Y und A631V**

### **5.1.1.1 Klinik**

Bei der aus Schottland stammenden Patientin begann die Muskelschwäche im Alter von 30 Jahren. Bei der klinischen Untersuchung zeigte sich, dass vor allem die Beckengürtelmuskulatur und die proximalen Muskelpartien der unteren Extremitäten betroffen waren, wobei der M. quadriceps ausgespart blieb. Die Patientin zeigte einen Steppergang mit bilateralen Fußheberpareesen. Sie hatte Schwierigkeiten auf Zehenspitzen zu stehen. Der Fersengang sowie eine Dorsalflexion der Füße waren nicht möglich. Außerdem bestand bei der Patientin eine Scapula alata.

Die neurophysiologische Untersuchung ergab, dass die Potentiale der motorischen Einheiten im Allgemeinen niedrig und verkürzt waren; im M. quadriceps zeigte sich hingegen ein normales Aktivitätsmuster.

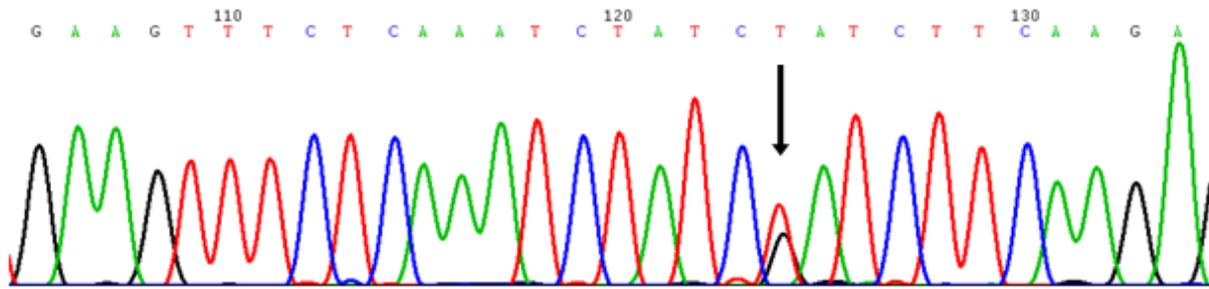
### **5.1.1.2 Mutationsanalyse**

Bei Patientin A wurde aufgrund der Klinik und des neurologischen Untersuchungsbefundes eine Sequenzanalyse der gesamten kodierenden Region des *GNE*-Gens mittels PCR-Amplifikation durchgeführt. Punktmutationen in der kodierenden Region dieses Gens verursachen die rezessiv vererbte Einschlusskörpermyopathie Typ 2.

Die Sequenzanalyse bestätigte die Arbeitshypothese, dass bei der Patientin eine hereditäre Einschlusskörpermyopathie Typ 2 vorliegt.

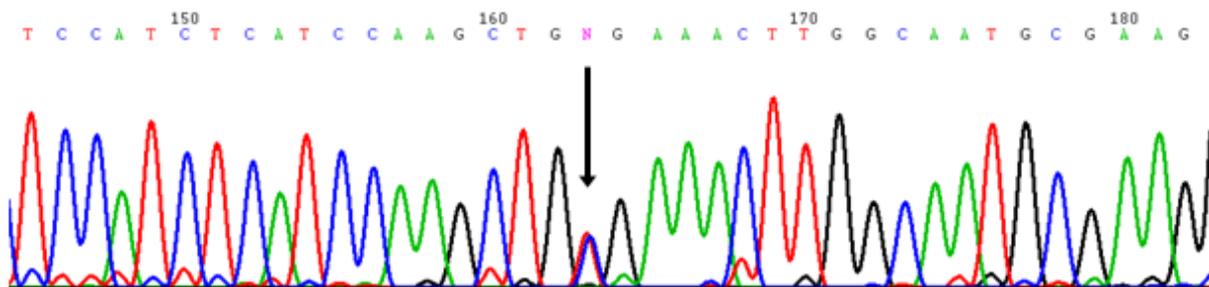
Es konnten die Mutationen D378Y in Exon 7 (Abb. 5) und A631V in Exon 11 (Abb. 6) molekulargenetisch gesichert werden. Die Mutation D378Y führt im Codon 378 zu einem Aminosäureaustausch, wobei Asparaginsäure gegen Tyrosin ausgetauscht wird. Bei der Mutation in Exon 11 wird Alanin durch Valin ersetzt.

Beide Mutationen sind bereits vorbeschrieben (Nishino, Noguchi et al. 2002).



**Abb. 5 Ausschnitt aus der Sequenz des 7. Exons des GNE-Gens**

Der Pfeil weist auf die Position der heterozygoten Mutation hin.



**Abb. 6 Ausschnitt aus der Sequenz des 11. Exons des GNE-Gens**

Der Pfeil weist auf die Position der heterozygoten Mutation hin.

## 5.1.2 Patientin B: Mutationen R246W und A310P

### 5.1.2.1 Klinik

Die aus Italien stammende Patientin bemerkte im Alter von 22 Jahren zunehmende Probleme beim Gehen aufgrund einer distalen Muskelschwäche. Anfangs war das Gehen auf den Fersen eingeschränkt, im weiteren Verlauf auch auf den Zehenspitzen. Nach einem Jahr war die Patientin auf Gehhilfen angewiesen. Die Patientin ist mittlerweile nur noch im Rollstuhl mobil. Das Gehen ist nur mit starker Unterstützung und Hilfe für wenige Schritte möglich.

Von der Muskelschwäche waren erst die distalen Anteile der unteren Extremitäten betroffen, später auch die proximalen, wobei die Muskulatur der Oberschenkelstrecker (M. quadriceps femoris) im Vergleich zur übrigen Muskulatur relativ kräftig blieb.

Ebenso verhielt es sich an den oberen Extremitäten. Anfangs bestand eine Kraftminderung an den Fingern; im weiteren Verlauf auch im Bereich von Händen und Armen.

Der neurologische Untersuchungsbefund ergab generalisierte atrophe Paresen, wobei die Muskulatur der Fußheber mit einem Kraftgrad von 3 - 4 / 5 am stärksten betroffen war. Die Waden waren weniger stark betroffen, der M. quadriceps blieb ausgespart.

Die Muskeigenreflexe der oberen Extremitäten waren beidseits schwach auslösbar, die der unteren Extremitäten nicht erhältlich.

Die labordiagnostische Auswertung ergab eine leichte Erhöhung der Serum-CK auf 230 U / l.

Das MRT der Unterschenkel zeigte eine fettige Degeneration der Muskulatur, passend zu den distal betonten atrophischen Beinpareesen von Kraftgrad 3 - 4 / 5.

Weiterhin wurden der Vater der Patientin und ihre 3 Jahre jüngere sowie ihre 7 Jahre jüngere Schwester untersucht. Beim Vater und der 3 Jahre jüngeren Schwester war der Untersuchungsbefund unauffällig.

Bei der jüngsten Schwester bestehen distal betonte Paresen mit symmetrischem Beginn in der unteren Extremität. In der Muskelbiopsie fanden sich „rimmed vacuoles“, die für eine Einschlusskörpermyopathie charakteristisch sind.

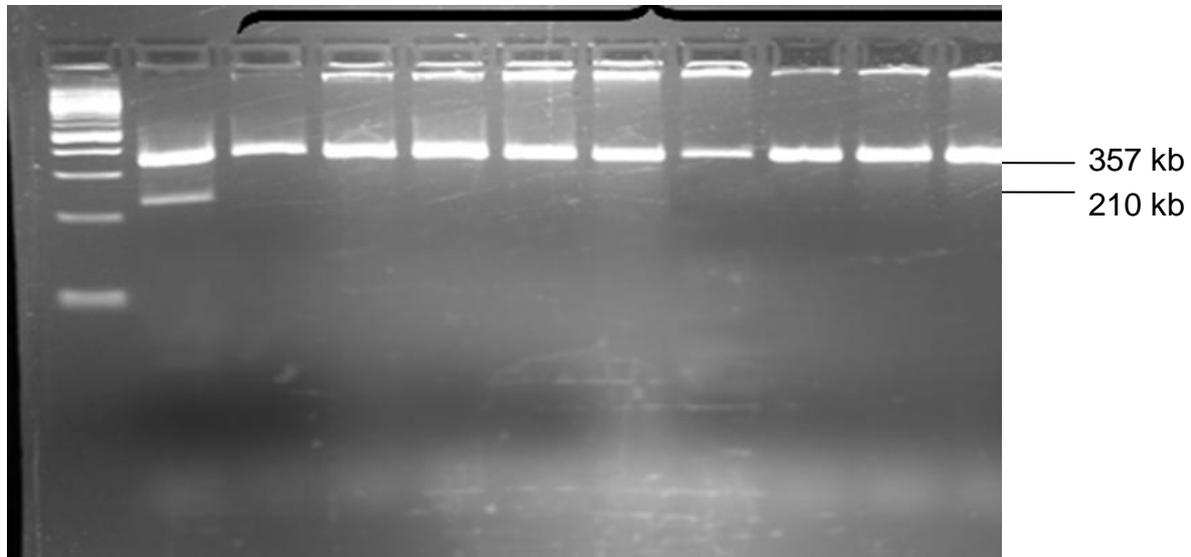
### **5.1.2.2 Mutationsanalyse**

Die Ergebnisse der Sequenzanalyse bei der italienischen Patientin bestätigten den Verdacht, dass es sich bei dieser Erkrankung um die HIBM2 handelt.

Die Chromatogramme zeigten im Exon 4 eine Missense-Mutation auf Position 246, die zu einem Aminosäureaustausch führt. Hierbei wird die Aminosäure Arginin gegen Tryptophan ausgetauscht (R246W). Diese Mutation ist bereits vorbeschrieben (Darvish, Vahedifar et al. 2002).

Die zweite Mutation befindet sich im Exon 5 im Codon 310 und bewirkt, dass anstelle der Aminosäure Alanin die Aminosäure Prolin translatiert wird. Die A310P-Mutation ist

nach heutigem Kenntnisstand nicht vorbeschrieben. Mittels Restriktionsverdau wurden 50 Kontrollchromosomen von gesunden Spendern untersucht. In den Kontrollen fand sich ausschließlich die Wildtyp-Sequenz (Abb. 7).



**Abb. 7 Repräsentative Gelelektrophorese der RFLP-Analyse auf die GNE-Mutation A310P**

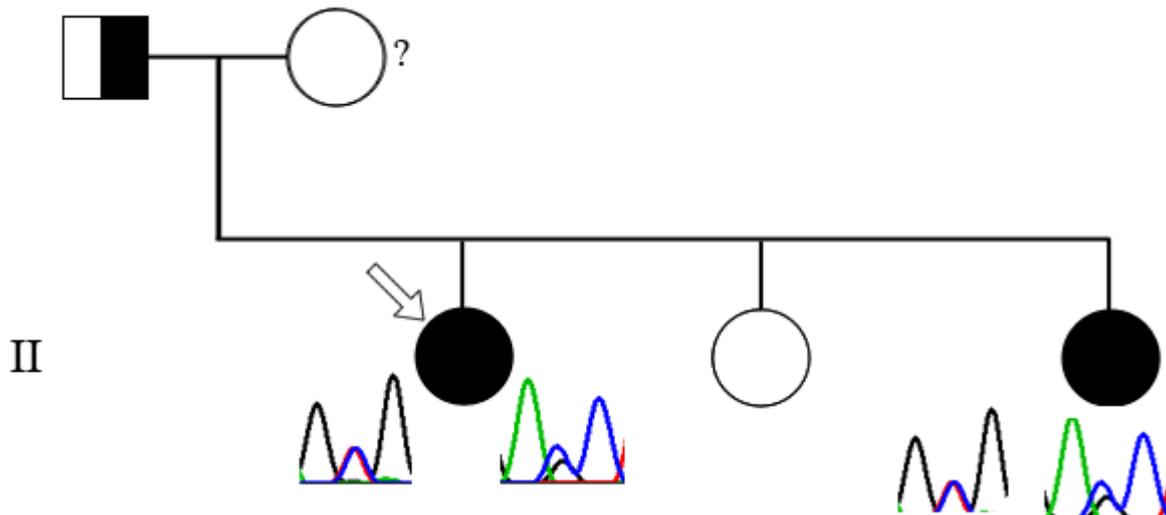
*Durch die Mutation entsteht heterozygot eine neue Alal –Restriktionsstelle. Deshalb wird das mutierte Fragment durch das Restriktionsenzym Alal geschnitten (210 bp), während das Wildtyp-Fragment ungeschnitten bleibt.*

Da die jüngste Schwester der Patientin ebenfalls von der Muskelschwäche betroffen ist, wurde auch hier eine Sequenzanalyse durchgeführt. Es fanden sich dieselben Mutationen, nämlich R246W und A310P, wie bei der Indexpatientin.

Bei der 3 Jahre jüngeren Schwester, die klinisch unauffällig ist, konnte keine Mutation nachgewiesen werden.

Beim gesunden Vater der Patientin wurde ebenfalls die Mutation R246W heterozygot gefunden. Dies spricht für einen autosomal-rezessiven Erbgang.

Bei der Mutter konnte leider keine Sequenzanalyse durchgeführt werden, da die DNA nicht verfügbar war. Es liegt jedoch der Verdacht nahe, dass die Mutter möglicherweise heterozygot die Mutation A310P trägt (Abb. 8).



**Abb. 8 Stammbaum der italienischen Familie (Patientin B)**

Das Bild zeigt den Vater als heterozygoten Träger der Mutation R246W. Bei der Mutter war eine Sequenzanalyse nicht möglich. Zwei von drei Töchtern tragen die compound heterozygoten Mutationen und sind erkrankt (schwarze Kreise), eine Tochter ist gesund (weißer Kreis).

### 5.1.3 Patienten C und D: Mutation I587T

#### 5.1.3.1 Klinik

Bei den Patienten mit der Mutation I587T handelt es sich um Angehörige der Volksgruppe der Roma.

Patient C ist 1989 geboren. Im Alter von 13 Jahren bemerkte er zunehmende Schwierigkeiten beim Treppensteigen. Im Alter von 17 Jahren war es ihm dann nicht mehr möglich, selbstständig Treppen hochzugehen.

Die klinisch-neurologische Untersuchung zeigte einen Steppergang, eine proximale und distale Muskelschwäche mit Aussparung des M. quadriceps femoris. In der manuellen Kraftgradprüfung fanden sich die Kraftgrade (nach MRC) im M. tibialis anterior von 2/5 bds. im M. gastrocnemius von 3/5 bds. und im M. iliopsoas von 4/5 bds. Die Reflexe der oberen Extremitäten und der Patellarsehnenreflex waren bds. abgeschwächt; der Achillessehnenreflex war bds. erloschen. Es bestanden außerdem symmetrische

Atrophien der Thenar- und Hypothenarmuskulatur, sowie im Bereich der Mm. tibialis anterior und interossei.

Bei der Patientin D, die nicht mit Patient C verwandt ist, machte sich die Erkrankung im Alter von 23 Jahren zunächst durch eine Fußheberschwäche bemerkbar. Es bestand ferner ein Bandscheibenprolaps im Bereich der Region L5–S1 mit positivem Lasegue-Zeichen. Die Muskelschwäche betrifft sowohl proximale als auch distale Muskelgruppen, wobei auch hier wiederum der M. quadriceps femoris nicht betroffen ist.

Die Serum-CK war mit 297 U/l leicht erhöht. Das EMG zeigte ein myopathisches Muster.

#### **5.1.3.2 Mutationsanalyse**

Aufgrund der klinischen Symptomatik beider Patienten und der ethnischen Herkunft wurde auch hier eine Sequenzanalyse des *GNE*-Gens durchgeführt. Zunächst wurde nur das Exon 10 auf Mutationen untersucht, da es sich bei beiden Patienten um Roma handelt und in der Literatur bereits bei 27 bulgarischen Roma-Patienten eine Form der HIBM2 beschrieben ist, die unter anderem mit einer Atrophie des Thenars einhergeht und der damit verbundenen Schwierigkeit kleine Gegenstände in den Händen halten zu können (Kalaydjieva, Lochmuller et al. 2005).

## **5.2 Analyse des Valosin-Containing Protein (VCP)-Gens**

Bei 40 Patienten mit der klinischen Verdachtsdiagnose einer hereditären Einschlußkörpermyopathie wurde das VCP-Gen auf Mutationen untersucht. Das VCP-Gen umfasst 17 Exons. Bei jedem Patienten wurden die Exons 3, 5 und 6 mit Hilfe direkter Sequenzanalyse untersucht, da diese drei Exons eine „hot spot“ Region für Mutationen im VCP-Gen darstellen, die die ursächlich für die IBMPFD sind. Bei einem Patienten wurde die Missense-Mutation R159H in Exon 5 identifiziert, die zu einem Aminosäureaustausch von Arginin zu Histidin führt.

### **5.2.1 Patient A: Mutation R159H**

#### **5.2.1.1 Klinik**

Bei dem Patienten handelt es sich um einen 72 jährigen Versandleiter. Im Alter von 56 Jahren wurde erstmals ein M. Paget der linken Beckenschaufel diagnostiziert. Fünf Jahre später wurde der Patient erneut aufgrund einer langsam progredienten Muskelschwäche stationär aufgenommen. Die Muskelschwäche ist linksseitig größer als rechtsseitig und armbetont.

Der klinische Untersuchungsbefund ergab eine Parese der proximalen Armmuskulatur mit Kraftgraden (nach MRC) von 3-4/5 sowie der M. biceps femoris ebenfalls von 3-4/5. Die betroffene Muskulatur war atrophisch. Im weiteren Verlauf nahm die Symptomatik deutlich zu; das Aufrichten aus dem Sitzen oder Liegen wurde beschwerlicher, Treppensteigen war kaum und das Tragen von Lasten nur eingeschränkt möglich. Die maximale Gehstrecke betrug einen Kilometer.

Das EMG zeigte ein myopathisches Schädigungsmuster. Im M. vastus medialis rechts fanden sich auch neurogene Schädigungszeichen, im M. triceps rechts deutlich deformierte Potentiale als Zeichen der höhergradigen Atrophie.

Das durchgeführte MRT wies auf eine fettige Degeneration der Muskulatur in beiden Oberschenkeln, in den Adduktoren und in den Mm. biceps femoris beidseits hin.

In der Muskelbiopsie fand sich ein liposkleröser Umbau.

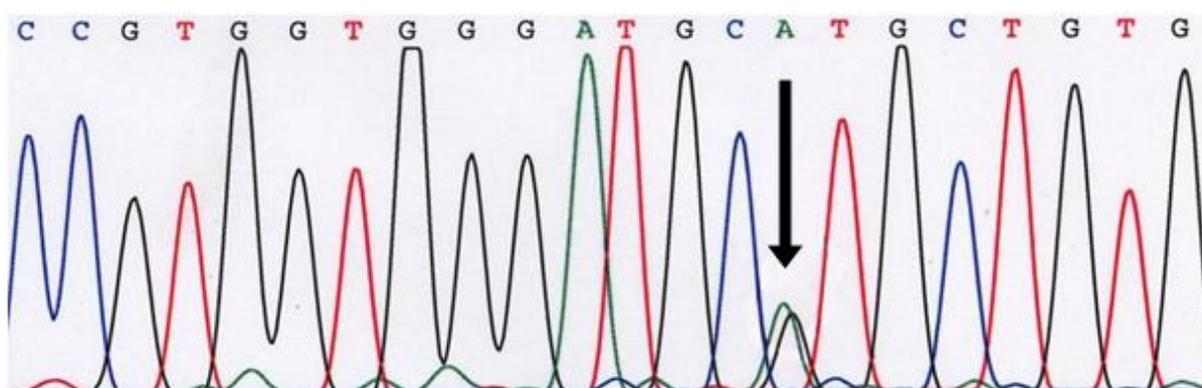
Die Laborwerte befanden sich allesamt im Normbereich mit Ausnahme der alkalischen Phosphatase. Diese war um das Vierfache des Normalwertes erhöht.

### 5.2.1.2 Mutationsanalyse

Aufgrund der klinischen Symptomatik des Patienten lag die Verdachtsdiagnose einer IBMPFD sehr nahe, die durch Mutationen im *VCP*-Gen verursacht wird,.

Dazu wurden die Exons 3, 5 und 6 des *VCP*-Gens auf Chromosom 9p12-13 sequenziert, da sich in diesen drei Exons die Mehrzahl der bisher gefundenen Mutationen befindet.

Es konnte bei Patient A eine heterozygote Missense-Mutation nachgewiesen werden. Diese befindet sich im Codon 159 des Exons 5. Dadurch kommt es zu einem Aminosäureaustausch, bei dem die Aminosäure Arginin durch Histidin ersetzt wird (Abb. 9).



**Abb. 9 Ausschnitt der Sequenz des 5. Exons des *VCP*-Gens**

Der Pfeil weist auf die Position der Mutation Arg159His hin, die in heterozygoter Form vorliegt.

## 6 DISKUSSION

### 6.1 Mutationen im *GNE*-Gen

In der vorliegenden Arbeit wurden bei insgesamt 4 von 40 Patienten Mutationen im *GNE*-Gen nachgewiesen. Das Gen kodiert für das gleichnamige Enzym, das eine Schlüsselfunktion in der Sialinsäurebiosynthese hat, so dass Mutationen, die mit HIBM2 assoziiert sind, zu einer reduzierten Enzymaktivität führen. Aufgrund der verminderten Enzymaktivität kann möglicherweise nicht genügend Sialinsäure synthetisiert werden. Diese Hypothese der Hyposialylierung wurde mittels Zell- und Gewebeproben von Patienten mit HIBM2 (Saito, Tomimitsu et al. 2004) und im Mausmodell, das die D176V-Mutation in einem *GNE*-Knock out-Hintergrund exprimiert, bekräftigt (Malicdan, Noguchi et al. 2007). Es ist bereits bekannt, dass Mäuse, bei denen das *GNE*-Gen ausgeschaltet wurde, im embryonalen Stadium verstarben (Schwarzkopf, Knobloch et al. 2002). Der Phänotyp der transgenen Mäuse mit der Mutation D176V ähnelte sehr dem Phänotyp bei Patienten mit HIBM2 hinsichtlich des Sialinsäurespiegels, der Serum-CK und der Muskelpathologie (Malicdan, Noguchi et al. 2007). Bezüglich der Muskelpathologie ist zu erwähnen, dass bei tierexperimentellen Studien mit Knock in-Mäusen, die die M712T-Mutation trugen, keine myopathischen Veränderungen nachweisbar waren (Galeano, Klootwijk et al. 2007). Überraschenderweise hatten die Mäuse eine glomeruläre Hämaturie und eine Podozytopathie mit verminderter Sialylierung des Podocalyxin (Galeano, Klootwijk et al. 2007). Podocalyxin ist das am häufigsten vorkommende Sialoglykoprotein in der Glykokalix der Podozyten (Horvat, Hovorka et al. 1986) und ist für die Funktion der Podozytenfortsätze von essentieller Bedeutung (Galeano, Klootwijk et al. 2007). Inwiefern die Podozytopathie typisch für die HIBM ist, lässt sich nicht sicher beurteilen. Es konnte bis jetzt bei Patienten mit einer M712T Mutation keine Podozytopathie festgestellt werden. Es könnte sich somit um ein tierexperimentelles Phänomen handeln. Um dies abschließend zu klären, sind jedoch weitere Studien nötig.

Andere Studien konnten nachweisen, dass eine Hyposialylierung des alpha-Dystroglykans zu einer gestörten Interaktion mit extrazellulären Matrixproteinen führt und somit die HIBM zu der Gruppe der „Dystroglykanopathien“ gezählt werden könnte (Huizing, Rakocevic et al. 2004). In der Membran des Skelettmuskels sind Dystroglykane Teil des Dystrophin-Glykoprotein-Komplex (DGC). Dieser Komplex ist für die Stabilität des Sarkolemm während des Kontraktions- und Relaxationszyklus verantwortlich, indem er Actin mit Komponenten der extrazellulären Matrix verbindet (Michele and Campbell 2003). Broccolini et al. wiederum konnte zeigen, dass im Muskel bei vier von fünf HIBM-Patienten zwar alpha-Dystroglykan reduziert war, dies jedoch nicht zu einer fehlerhaften Bindung mit Laminin führte (Broccolini, Gliubizzi et al. 2005). Laminin ist Teil der extrazellulären Matrix und ist von großer Bedeutung für die Zelladhäsion (Colognato, MacCarrick et al. 1997). Eine fehlerhafte Bildung von Laminin führt zur Muskeldystrophie (Wewer and Engvall 1996).

In anderen Fällen wurden jedoch normale Sialinsäure-Spiegel bei Patienten mit HIBM gefunden (Hinderlich, Salama et al. 2004), so dass nahe liegt, dass die verminderte Enzymaktivität von GNE nicht allein für das klinische Bild der HIBM verantwortlich gemacht werden kann.

### **6.1.1 Die compound heterozygoten Mutationen D378Y und A631V**

Die compound heterozygoten Mutationen D378Y und A631V wurden bei einer 32jährigen Patientin aus Schottland molekulargenetisch nachgewiesen. Die Mutation D378Y liegt auf Exon 7 in der Epimerasedomäne und die Mutation A631V auf Exon 11 in der Kinasedomäne des *GNE*-Gens. Beide Mutationen sind bereits bei einer irischen Patientin (Eisenberg, Grabov-Nardini et al. 2003) und einem japanischen Patienten (Nishino, Noguchi et al. 2002) beschrieben worden. Bei allen drei Patienten war der M. quadriceps femoris von einer Muskelschwäche ausgespart. Die Erkrankung manifestierte sich erstmals durch eine distale Fußheberparese. Die Serum-CK war bei der schottischen und der irischen Patientin nur leicht erhöht. Von dem japanischen Patienten liegen hierzu keine Daten vor.

Verschiedenste Studien konnten mittlerweile Mutationen im *GNE*-Gen nachweisen, die zur HIBM2 führen. Die Mutationen liegen entweder in der Epimerasedomäne oder in der Kinasedomäne oder aber auch in beiden Domänen. Gemeinsam ist diesen Mutationen,

dass sie alle eine Myopathie verursachen, die den M. quadriceps femoris ausspart. Im Gegensatz dazu kommt es bei der Sialurie nur zu Mutationen in der Region des *GNE*-Gens, die für die Feedback-Inhibition von GNE verantwortlich ist, was dann zu einer Überproduktion von Sialinsäure führt, da die Endprodukthemmung der Sialinsäurebiosynthese gestört ist (Eisenberg, Avidan et al. 2001). Es konnte bis heute noch nicht geklärt werden, weshalb der M. quadriceps femoris bei HIBM2 von Atrophie und Muskelschwäche ausgespart bleibt. Es wird sich zeigen, ob die Identifizierung weiterer Mutationen im *GNE*-Gen dazu beitragen kann, dieses Phänomen erklären zu können.

### **6.1.2 Die compound heterozygoten Mutationen R246W und A310P**

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde bei einer italienischen Patientin die compound heterozygote Mutation R246W in Exon 4 und A310P in Exon 5 gesichert. Interessanterweise wurde bei der jüngeren Schwester, die ebenfalls klinisch betroffen ist, dieselbe Mutation gefunden. Die Mutation A310P ist noch nicht vorbeschrieben, die Mutation R246W wurde 2002 erstmals beschrieben (Darvish, Vahedifar et al. 2002). Es handelt sich hierbei um eine kalifornische Patientin irischer Abstammung. Sowohl bei der kalifornischen als auch bei der italienischen Patientin war die Mutation vom Vater vererbt worden, der phänotypisch gesund war. Man kann davon ausgehen, dass die Kombination der beiden heterozygot vorliegenden Punktmutationen zu dem seltenen Krankheitsbild der hereditären Einschlusskörpermyopathie führt.

In den letzten Jahren wurde es offensichtlich, dass hereditäre Myopathien in verschiedenen genetischen Ethnien vorkommen und nicht nur auf eine bestimmte Volksgruppe limitiert sind (Mirabella, Christodoulou et al. 2000). Außerdem können andere Formen von Myopathien, die sich klinisch unterschiedlich äußern, auch andere Gene betreffen, wie beispielsweise die IBMPFD (Kovach, Waggoner et al. 2001).

### **6.1.3 Die „Gypsy“ - Mutation I587T**

Bei zwei bulgarischen Patienten, die der Volksgruppe der Roma angehören, wurde die homozygote Mutation I587T in Exon 10 gefunden. Diese Mutation verursacht einen Aminosäureaustausch von Isoleucin nach Threonin. Ivailo Tournev beschrieb bereits 27 bulgarische Patienten mit dieser Mutation (Kalaydjieva, Lochmuller et al. 2005). Interessanterweise standen bei diesen Patienten eine Thenaratrophy und Herzrhythmusstörungen im Vordergrund (Kalaydjieva, Lochmuller et al. 2005). Bei einem von den zwei Patienten, der im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurde, bestand ebenfalls eine Thenaratrophy. Ob für die Thenaratrophy die Mutation I587T verantwortlich ist, lässt sich aufgrund des zu geringen Patientenkollektivs nicht sicher beweisen. Dafür bedarf es sicherlich weiterer Studien, um das phänotypische Spektrum dieser speziellen Form der HIBM2 in der Volksgruppe der Roma zu untersuchen. Aufgrund der Assoziation mit Herzrhythmusstörungen ist es für die Patienten mit dieser Mutation von großer Bedeutung frühzeitig eine genetische Diagnostik durchzuführen. Dadurch könnten bei positivem Befund kardiologische Voruntersuchungen durchgeführt werden, um eventuelle Herzrhythmusstörungen aufzudecken und die entsprechenden Therapien, wie beispielsweise Antiarrhythmika oder gegebenenfalls Herzschrittmacher, einzuleiten.

## **6.2 Mutationen im VCP - Gen**

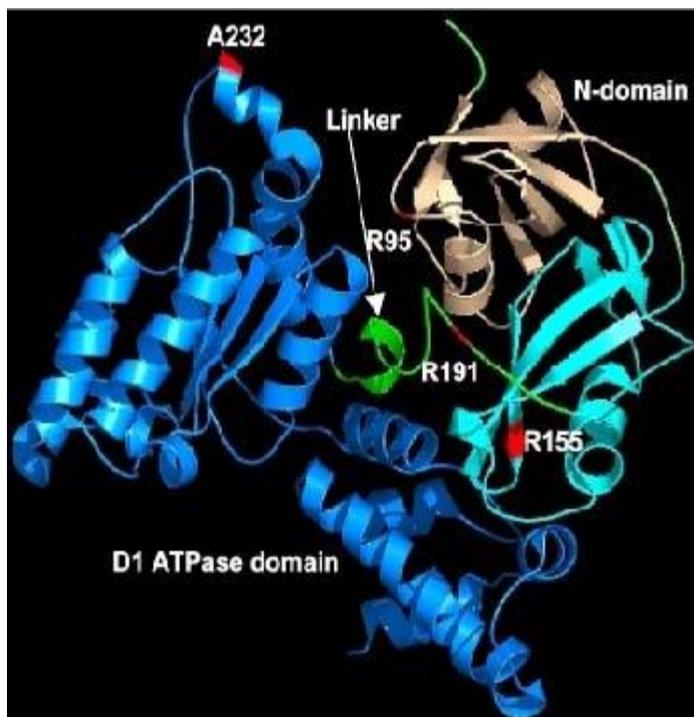
In dieser Arbeit wurden bei 40 Patienten mit der Verdachtsdiagnose einer hereditären Einschlusskörpermyopathie Mutationen oder genetische Veränderungen im VCP-Gen untersucht. Mutationen im VCP-Gen verursachen das sehr seltene Krankheitsbild der IBMPFD, die aus der Trias Einschlusskörpermyopathie, M. Paget (PDB) und einer frontotemporalen Demenz besteht.

Obwohl die Prävalenz der IBMPFD nicht bekannt ist, ist diese Erkrankung äußerst selten. Bislang wurden in 20 Familien Mutationen identifiziert. Die meisten der bislang

13 gesicherten Mutationen befinden sich auf den Exons 3, 5 oder 6. Eine Mutation befindet sich auf Exon 7, eine weitere auf Exon 10 (Kimonis, Fulchiero et al. 2008).

### 6.2.1 Die Mutation R159H

Eine „hot spot“ Region wurde im Exon 5 auf Position 155 des *VCP*-Gens bereits beschrieben (Watts, Wymer et al. 2004) (Abb. 10). Bei den meisten Patienten mit einer Mutation an dieser Position wurde ein Aminosäureaustausch von Arginin zu Histidin beschrieben.



**Abb. 10 Bändermodell des VCP-Enzyms**

Dargestellt ist ein Bändermodell des VCP-Enzyms mit Mutationen im Wildtyp ([www.ibmpfd.com](http://www.ibmpfd.com)).

Die Mutation, die in dieser Doktorarbeit beschrieben wird, liegt lediglich vier Aminosäuren entfernt von der „hot spot“-Position 155 und hat denselben Aminosäureaustausch. Der Proteinabgleich verschiedener Spezies zeigt eine starke Konservierung des Codons 155 (Haubenberger, Bittner et al. 2005) (Abb. 11) Dieselbe Mutation wurde bereits von Haubenberger et al. 2005 beschrieben.

Gemeinsam war den Patienten mit der Mutation R159H, dass die Erkrankung sich zuerst mit einem M. Paget manifestierte, der jeweils in der Beckenregion begann und das Manifestationsalter bei beiden Patienten um die 55 Jahre betrug. Später entwickelte sich eine Myopathie.

Die Nähe der Mutation zur „hot spot“ Region, die starke Konservierung des Codons und die ähnliche Klinik der Patienten mit derselben Mutation legen den Schluss nahe, dass der Aminosäureaustausch R159H das Krankheitsbild der IBMPFD verursacht.

<b>R159</b>	
G <b>M</b> RAV	<i>H. sapiens</i>
G <b>M</b> RAV	<i>R. norvegicus</i>
G <b>M</b> RAV	<i>M. musculus</i>
A <b>M</b> RPI	<i>D. melanogaster</i>
A <b>M</b> RTV	<i>C. elegans</i>
G <b>M</b> RQV	<i>S. cerevisiae</i>
S <b>M</b> RQV	<i>S. pombe</i>

**Abb. 11 Proteinabgleich verschiedener Spezies**

Der Proteinabgleich zeigt eine starke Konservierung des Kodons 159 (Haubenberger, Bittner et al. 2005)

Überraschenderweise wies jedoch keiner der Patienten eine frontotemporale Demenz auf. Das typische Alter für den Beginn einer FTD bei der IBMPFD liegt bei ungefähr 53 Jahren (Kovach, Waggoner et al. 2001). Die Patienten sind mittlerweile über 70 Jahre alt. Allerdings muss erwähnt werden, dass eine frontotemporale Demenz lediglich bei 30% der Patienten mit IBMPFD beobachtet wird (Watts, Wymer et al. 2004).

Kürzlich wurde eine neue Mutation R155C , bei einem Patienten mit einer Myopathie und einer frontotemporalen Demenz, nachgewiesen, der jedoch keinen M. Paget entwickelt hatte (Schroder, Watts et al. 2005).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die einzelnen Entitäten der Trias aus IBM, PDB und FTD bei Trägern von Mutationen im VCP-Gen höchst variabel in Erscheinung treten. Sogar bei Mutationsträgern innerhalb der gleichen Familie kann die Symptomatik sehr unterschiedlich ausgeprägt sein, was eine Auskunft über die Erkrankungsprognose und eine Genotyp-Phänotyp-Korrelation sehr erschwert

## 6.3 Phänotyp

### 6.3.1 Phänotyp bei Patienten mit HIBM2

Zur Abgrenzung gegenüber anderen Muskelerkrankungen sollte man bei der hereditären Einschlusskörpermyopathie Typ 2 zunächst das klinische Bild des Patienten berücksichtigen. Die Erkrankung manifestiert sich meistens zwischen dem 20. und 30. Lebensjahr durch eine Muskelschwäche, die sowohl proximale als auch distale Muskelgruppen betreffen kann. Die Hirnnerven werden ausgespart, ganz selten kann es zu einer Ptosis kommen. Die Erkrankung schreitet langsam voran und führt nach circa zehn bis zwanzig Jahren zur Rollstuhlpflichtigkeit.

Die in dieser Arbeit beschriebenen Patienten mit HIBM2 zeigen weitgehend diese Symptomatik.

Bei den italienischen Schwestern, die beide die compound heterozygote Mutationen R246W und A310P haben, manifestierte sich die Erkrankung im 22. bzw. 25. Lebensjahr. Bei beiden Schwestern waren sowohl die Muskelatrophie als auch die Paresen vom distalen Typ progredient. Die Muskulatur der Oberschenkelstrecker ist im Gegensatz zur übrigen Muskulatur kräftig geblieben. Die ältere Schwester ist nach einem Krankheitsverlauf von circa 10 Jahren rollstuhlpflichtig.

Bei der schottischen Patientin mit den compound heterozygoten Mutationen D378Y und A631V manifestierte sich die Erkrankung um das 30. Lebensjahr, was gut mit den „typischen“ Manifestationsalter der HIBM2 korreliert. Auch hier ließ sich eine Aussparung des M. quadriceps sowohl klinisch als auch im MRT zeigen.

Es lässt sich jedoch keine Aussage treffen, inwieweit der Phänotyp der Patienten mit dem jeweiligen Genotyp korreliert, da zum einem das Patientenkollektiv mit HIBM2 zu klein ist und zum anderen ist es in verschiedenen Studien noch nicht gelungen eine exakte Korrelation zwischen Phänotyp und Genotyp herauszuarbeiten. Außerdem ist die heterozygote Mutation A310P bei der italienischen Patientin erstmals beschrieben worden und es gibt somit keine anderen Patienten, mit denen man den Phänotyp dieser Mutation vergleichen könnte. Es scheint sich jedoch zu bestätigen, dass der M.

quadriceps femoris ausgespart bleibt und das Manifestationsalter zwischen dem 20. und 30. Lebensjahr liegt.

Zusammenfassend bleibt die autosomal-rezessiv vererbte hereditäre Einschlusskörpermyopathie Typ 2 eine sehr seltene Erkrankung mit einem heterogenen klinischen Bild.

### **6.3.2 Phänotyp bei Patienten mit IBMPFD**

Das klinische Bild der Patienten mit IBMPFD ist vor allem durch eine Muskelschwäche gekennzeichnet die sich meistens zwischen dem 30. und 40. Lebensjahr manifestiert. Die Muskelschwäche ist oft asymmetrisch und kann sich sowohl in der proximalen als auch in der distalen Muskulatur der oberen oder unteren Extremitäten äußern. Viele Patienten klagen auch über Rückenschmerzen. Einige von ihnen zeigen eine Scapula alata.

Der Verlauf der IBMPFD ist langsam progredient. Im späten Verlauf kann es zu einer Kardiomyopathie oder zu einer respiratorischen Dysfunktion kommen. Die Patienten versterben im Alter von circa 60 Jahren.

In 43% der Fälle ist die IBMPFD mit einem M. Paget assoziiert, der am häufigsten in der Wirbelsäule vorkommt. Andere Manifestationsorte sind Becken, Schädel und Hüfte. Das Erkrankungsalter liegt hier mit durchschnittlich 43 Jahren etwas über dem der Muskelschwäche.

Bei 37% der Patienten kommt es ferner zu einer frontotemporalen Demenz, die relativ spät im Verlauf der Erkrankung auftritt; im Vergleich zu anderen Demenzformen hat sie dennoch mit einem Durchschnittsalter von 54 Jahren ein sehr frühes Manifestationsalter.

Bei dem in dieser Arbeit beschriebenen Patienten mit der Mutation R159H trat sowohl eine Muskelschwäche als auch ein M. Paget auf, jedoch keine frontotemporale Demenz. Auffällig erscheint, dass die IBMPFD sich zuerst durch einen M. Paget manifestiert hat und circa vier Jahre später Beschwerden im Bereich des muskuloskelettalen Bereichs auftraten.

Die Mutation R159H, die zu einem Austausch der Aminosäure von Arginin zu Histidin führt, ist bereits vorbeschrieben (Haubenberger, Bittner et al. 2005).

Bemerkenswert ist, dass sowohl bei dem vorbeschriebenen Patienten als auch bei dem in dieser Arbeit beschriebenen Patienten keine frontotemporale Demenz aufgetreten ist. Beide Patienten benötigen bis heute keinen Rollstuhl.

Ob das Fehlen einer Demenz und der mildere Phänotyp bei diesen beiden Patienten auf die Mutation R159H zurückzuführen ist, lässt sich nicht eindeutig nachweisen. Dafür bedarf es sicherlich der Untersuchung weiterer Patienten, die eine Phänotyp-Genotyp Korrelation erlauben.

## **6.4 Bedeutung molekulargenetischer Analysen für die Diagnostik der Myopathien**

Im klinischen Alltag ist die Diagnosestellung der hereditären Einschlusskörpermyopathien oft erschwert durch das heterogene klinische Bild und den überlappenden Phänotyp der einzelnen Erkrankungen, sowie die Seltenheit und damit auch die Unkenntnis der Kliniker hinsichtlich dieser Erkrankungen.

Vergleichende klinische Daten könnten es ermöglichen, eine Korrelation von Phänotyp und Genotyp herzustellen und somit die genetische Diagnostik erleichtern. Andererseits können sich genotypisch ähnliche oder sogar identische Defekte klinisch völlig anders manifestieren. Es können aber auch verschiedene genetisch bedingte Pathomechanismen in ähnlichen phänotypischen Ausprägungen resultieren.

#### 6.4.1 Bedeutung der Diagnostik bei der HIBM2

Die laborchemischen Werte bei der hereditären Einschlusskörpermyopathie Typ 2 sind wenig aussagekräftig; sollten aber unbedingt durchgeführt werden. An erster Stelle steht hier im Rahmen der Routinediagnostik die Serum-CK, die oft mit einer zwei- bis fünffachen Erhöhung über dem Referenzwert einhergeht. Ferner kann noch die Sialinsäure im Urin bestimmt werden, da das GNE-Enzym eine wichtige Rolle in der Sialinsäurebiosynthese spielt. Bei der HIBM2 ist dieser Wert üblicherweise im Normbereich und hat keinen Stellenwert in der klinischen Labordiagnostik.

Ein EMG und eine NLG gehören ebenfalls zur Standarddiagnostik. Hierbei zeigt das EMG oft Spontanaktivität und ein myopathisches Muster.

Die Bildgebung mittels Magnetresonanztomographie zeigt eine Aussparung des M. quadriceps femoris, was fast schon pathognomisch für die HIBM2 ist während die übrigen Muskelgruppen im Bereich des Oberschenkels oft deutlich degenerativ verändert sind.

In der Muskelbiopsie können lichtmikroskopisch häufig hyper- und hypotrophe Muskelfasern nebeneinander beobachtet werden. Ferner sieht man „rimmed vacuoles“, die teilweise Ubiquitin oder beta-APP enthalten. Im Zytoplasma und Nukleus können in der Elektronenmikroskopie filamentöse Einschlüsse mit einem Durchmesser von 15-18 nm nachgewiesen werden. Entzündungen sind eher ungewöhnlich, sind jedoch schon beschrieben worden (Krause, Schlotter-Weigel et al. 2003; Yabe, Higashi et al. 2003). Außerdem fanden sich Hinweise auf eine Reduktion von alpha-Dystroglykan (Huizing, Rakocevic et al. 2004).

Das wichtigste diagnostische Mittel aber ist nach wie vor die genetische Analyse des *GNE*-Gens. Durch eine Reihe von Studien konnte nachgewiesen werden, dass Mutationen, wie sie in dieser Arbeit diskutiert wurden, zu dem Krankheitsbild der hereditären Einschlusskörpermyopathie Typ 2 führen. Es bleibt jedoch offen, wie sich die verschiedenen Mutationen auf den individuellen Phänotyp auswirken.

## 6.4.2 Bedeutung der Diagnostik bei der IBMPFD

Zur Abgrenzung andere Myopathiefornen ist es auch bei der IBMPFD nötig, das klinische Erscheinungsbild mit diagnostischen Kriterien in Einklang zu bringen.

Auch hier ist die molekulargenetische Untersuchung das wichtigste diagnostische Mittel, um eine IBMPFD zu diagnostizieren. Die verschiedenen Mutationsformen im *VCP*-Gen sind in dieser Arbeit schon ausführlich beschrieben worden.

Bevor man jedoch eine molekulargenetische Analyse durchführt, sollten Voruntersuchungen durchgeführt werden, um das Krankheitsbild besser eingrenzen zu können. Dies erspart Zeit und Kosten, da man so eventuell schneller nach den verursachenden Mutationen im entsprechenden Gen suchen kann.

Zunächst sollten routinemäßig die CK und die alkalische Phosphatase (AP) im Serum bestimmt werden. Bei der IBMPFD ist die Serum-CK nicht oder nur mäßig erhöht. Die AP ist erhöht, vor allem, wenn ein M. Paget mit der IBMPFD assoziiert vorliegt.

Das Elektromyogramm zeigt Spontanaktivität, Fibrillationen und positive scharfe Wellen sowie ein myopathisches Muster mit kleinen Amplituden und kleinen polyphasischen Potentialen der motorischen Einheiten. Die NLG ist in der Regel ohne pathologischen Befund.

In der Muskelbiopsie können atrophe und vereinzelte hypertrophierte Muskelfasern nebeneinander gesehen werden.

Im späten Verlauf der Erkrankung sollten noch ein Echokardiogramm und eine Lungenfunktionsprüfung durchgeführt werden, da die IBMPFD zu einer Kardiomyopathie und zu einer respiratorischen Dysfunktion durch Beteiligung der Atemhilfsmuskulatur führen kann.

Radiologisch und nuklearmedizinisch lässt sich ein M. Paget nachweisen. Zum Nachweis einer frontotemporalen Demenz kann *post mortem* eine Hirnsektion durchgeführt werden. Hier ist oft eine kortikale Atrophie zu beobachten.

Aufgrund der Seltenheit dieses Krankheitsbildes und auch dem heterogenen klinischen Bild bleibt eine schnelle Diagnostik wahrscheinlich eher neuromuskulären Zentren vorbehalten, die Erfahrung mit hereditären Muskelerkrankungen haben.

Auch wenn genetisch bedingte neuromuskuläre Erkrankungen sehr selten sind, ist die molekulargenetische Charakterisierung hereditärer Einschlusskörpermyopathien von essentieller Bedeutung für die klinische Erfassung, Betreuung, Therapie und genetische Beratung des einzelnen Patienten. Aufgrund der großen Variabilität des klinischen Erscheinungsbildes ergibt sich die Aufgabe, einerseits neue Mutationen und eventuell neue Gene zu identifizieren, die dann Eingang in ein Mutations-Screening betroffener Patienten finden könnten. Andererseits ermöglicht die Entdeckung bereits identifizierter Mutationen, die Pathogenität dieser Mutationen zu konsolidieren und diese genauer zu beschreiben. Je größer das Patientenkollektiv ist, desto genauere Aussagen über Häufigkeit und Verteilung von Mutationen können gemacht werden. Dies führt auch zu einer exakteren genetischen Beratung des Patienten aber auch dessen Familienangehörigen, die im Hinblick auf die präventive Diagnostik bezüglich der kardialen und / oder respiratorischen Situation sehr wichtig ist. Nicht weniger wichtig ist die genaue Kenntnis der Mutationen hinsichtlich einer zukünftigen gentherapeutischen Option oder anderen spezifischen therapeutischen Strategien.

## 7 LITERATURVERZEICHNIS

- Argov, Z., I. Eisenberg, et al. (2003). "Hereditary inclusion body myopathy: the Middle Eastern genetic cluster." Neurology **60**(9): 1519-23.
- Argov, Z., E. Tiram, et al. (1997). "Various types of hereditary inclusion body myopathies map to chromosome 9p1-q1." Ann Neurol **41**(4): 548-51.
- Argov, Z. and R. Yarom (1984). "'Rimmed vacuole myopathy' sparing the quadriceps. A unique disorder in Iranian Jews." J Neurol Sci **64**(1): 33-43.
- Askanas, V., W. K. Engel, et al. (1998). "Light and electron microscopic immunolocalization of presenilin 1 in abnormal muscle fibers of patients with sporadic inclusion-body myositis and autosomal-recessive inclusion-body myopathy." Am J Pathol **152**(4): 889-95.
- Banwell, B. L. and A. G. Engel (2000). "AlphaB-crystallin immunolocalization yields new insights into inclusion body myositis." Neurology **54**(5): 1033-41.
- Broccolini, A., C. Gliubizzi, et al. (2005). "alpha-Dystroglycan does not play a major pathogenic role in autosomal recessive hereditary inclusion-body myopathy." Neuromuscul Disord **15**(2): 177-84.
- Chou, S. M. (1986). "Inclusion body myositis: a chronic persistent mumps myositis?" Hum Pathol **17**(8): 765-77.
- Ciechanover, A. and P. Brundin (2003). "The ubiquitin proteasome system in neurodegenerative diseases: sometimes the chicken, sometimes the egg." Neuron **40**(2): 427-46.
- Colognato, H., M. MacCarrick, et al. (1997). "The laminin alpha2-chain short arm mediates cell adhesion through both the alpha1beta1 and alpha2beta1 integrins." J Biol Chem **272**(46): 29330-6.

- Dalakas, M. (2008). "IVIg in other autoimmune neurological disorders: current status and future prospects." J Neurol **255 Suppl 3**: 12-6.
- Dalakas, M. C., B. Sonies, et al. (1997). "Treatment of inclusion-body myositis with IVIg: a double-blind, placebo-controlled study." Neurology **48**(3): 712-6.
- Darin, N., M. Kyllerman, et al. (1998). "Autosomal dominant myopathy with congenital joint contractures, ophthalmoplegia, and rimmed vacuoles." Ann Neurol **44**(2): 242-8.
- Daroszewska, A. and S. H. Ralston (2005). "Genetics of Paget's disease of bone." Clin Sci (Lond) **109**(3): 257-63.
- Darvish, D., P. Vahedifar, et al. (2002). "Four novel mutations associated with autosomal recessive inclusion body myopathy (MIM: 600737)." Mol Genet Metab **77**(3): 252-6.
- Dennis, J. W. and S. Laferte (1985). "Recognition of asparagine-linked oligosaccharides on murine tumor cells by natural killer cells." Cancer Res **45**(12 Pt 1): 6034-40.
- Edelman, G. M. and K. L. Crossin (1991). "Cell adhesion molecules: implications for a molecular histology." Annu Rev Biochem **60**: 155-90.
- Eisenberg, I., N. Avidan, et al. (2001). "The UDP-N-acetylglucosamine 2-epimerase/N-acetylmannosamine kinase gene is mutated in recessive hereditary inclusion body myopathy." Nat Genet **29**(1): 83-7.
- Eisenberg, I., G. Grabov-Nardini, et al. (2003). "Mutations spectrum of GNE in hereditary inclusion body myopathy sparing the quadriceps." Hum Mutat **21**(1): 99.
- Eisenberg, I., H. Hochner, et al. (2001). "Physical and transcriptional map of the hereditary inclusion body myopathy locus on chromosome 9p12-p13." Eur J Hum Genet **9**(7): 501-9.
- Forman, M. S., I. R. Mackenzie, et al. (2006). "Novel ubiquitin neuropathology in frontotemporal dementia with valosin-containing protein gene mutations." J Neuropathol Exp Neurol **65**(6): 571-81.

- Galeano, B., R. Klootwijk, et al. (2007). "Mutation in the key enzyme of sialic acid biosynthesis causes severe glomerular proteinuria and is rescued by N-acetylmannosamine." J Clin Invest **117**(6): 1585-94.
- Garlepp, M. J., B. Laing, et al. (1994). "HLA associations with inclusion body myositis." Clin Exp Immunol **98**(1): 40-5.
- Geetha, T. and M. W. Wooten (2002). "Structure and functional properties of the ubiquitin binding protein p62." FEBS Lett **512**(1-3): 19-24.
- Goebel, H. and M. Fardeau (2004). "121st ENMC International Workshop on Desmin and Protein Aggregate Myopathies. 7-9 November 2003, Naarden, The Netherlands." Neuromuscul Disord **14**(11): 767-73.
- Guyant-Marechal, L., A. Laquerriere, et al. (2006). "Valosin-containing protein gene mutations: clinical and neuropathologic features." Neurology **67**(4): 644-51.
- Hamdy, R. C. (1995). "Clinical features and pharmacologic treatment of Paget's disease." Endocrinol Metab Clin North Am **24**(2): 421-36.
- Haubenberger, D., R. E. Bittner, et al. (2005). "Inclusion body myopathy and Paget disease is linked to a novel mutation in the VCP gene." Neurology **65**(8): 1304-5.
- Hinderlich, S., I. Salama, et al. (2004). "The homozygous M712T mutation of UDP-N-acetylglucosamine 2-epimerase/N-acetylmannosamine kinase results in reduced enzyme activities but not in altered overall cellular sialylation in hereditary inclusion body myopathy." FEBS Lett **566**(1-3): 105-9.
- Horvat, R., A. Hovorka, et al. (1986). "Endothelial cell membranes contain podocalyxin-- the major sialoprotein of visceral glomerular epithelial cells." J Cell Biol **102**(2): 484-91.
- Hubbers, C. U., C. S. Clemen, et al. (2007). "Pathological consequences of VCP mutations on human striated muscle." Brain **130**(Pt 2): 381-93.
- Huizing, M., G. Rakocevic, et al. (2004). "Hypoglycosylation of alpha-dystroglycan in patients with hereditary IBM due to GNE mutations." Mol Genet Metab **81**(3): 196-202.

- Kalaydjieva, L., H. Lochmuller, et al. (2005). "125th ENMC International Workshop: Neuromuscular disorders in the Roma (Gypsy) population, 23-25 April 2004, Naarden, The Netherlands." Neuromuscul Disord **15**(1): 65-71.
- Kean, E. L., A. K. Munster-Kuhnel, et al. (2004). "CMP-sialic acid synthetase of the nucleus." Biochim Biophys Acta **1673**(1-2): 56-65.
- Kimonis, V. E., E. Fulchiero, et al. (2008). "VCP disease associated with myopathy, Paget disease of bone and frontotemporal dementia: review of a unique disorder." Biochim Biophys Acta **1782**(12): 744-8.
- Kimonis, V. E., M. J. Kovach, et al. (2000). "Clinical and molecular studies in a unique family with autosomal dominant limb-girdle muscular dystrophy and Paget disease of bone." Genet Med **2**(4): 232-41.
- Kimonis, V. E., S. G. Mehta, et al. (2008). "Clinical studies in familial VCP myopathy associated with Paget disease of bone and frontotemporal dementia." Am J Med Genet A **146A**(6): 745-57.
- Kovach, M. J., B. Waggoner, et al. (2001). "Clinical delineation and localization to chromosome 9p13.3-p12 of a unique dominant disorder in four families: hereditary inclusion body myopathy, Paget disease of bone, and frontotemporal dementia." Mol Genet Metab **74**(4): 458-75.
- Krause, S., S. Hinderlich, et al. (2005). "Localization of UDP-GlcNAc 2-epimerase/ManAc kinase (GNE) in the Golgi complex and the nucleus of mammalian cells." Exp Cell Res **304**(2): 365-79.
- Krause, S., B. Schlotter-Weigel, et al. (2003). "A novel homozygous missense mutation in the GNE gene of a patient with quadriceps-sparing hereditary inclusion body myopathy associated with muscle inflammation." Neuromuscul Disord **13**(10): 830-4.
- Malicdan, M. C., S. Noguchi, et al. (2007). "A Gne knockout mouse expressing human V572L mutation develops features similar to distal myopathy with rimmed vacuoles or hereditary inclusion body myopathy." Hum Mol Genet **16**(2): 115-28.
- Matrosovich, M. and H. D. Klenk (2003). "Natural and synthetic sialic acid-containing inhibitors of influenza virus receptor binding." Rev Med Virol **13**(2): 85-97.

- Meyer, H. H., J. G. Shorter, et al. (2000). "A complex of mammalian ufd1 and npl4 links the AAA-ATPase, p97, to ubiquitin and nuclear transport pathways." Embo J **19**(10): 2181-92.
- Michele, D. E. and K. P. Campbell (2003). "Dystrophin-glycoprotein complex: post-translational processing and dystroglycan function." J Biol Chem **278**(18): 15457-60.
- Mirabella, M., K. Christodoulou, et al. (2000). "An Italian family with autosomal recessive quadriceps-sparing inclusion-body myopathy (ARQS-IBM) linked to chromosome 9p1." Neurol Sci **21**(2): 99-102.
- Mullis, K. B. (1990). "Target amplification for DNA analysis by the polymerase chain reaction." Ann Biol Clin (Paris) **48**(8): 579-82.
- Nishino, I., M. C. Malicdan, et al. (2005). "Molecular pathomechanism of distal myopathy with rimmed vacuoles." Acta Myol **24**(2): 80-3.
- Nishino, I., S. Noguchi, et al. (2002). "Distal myopathy with rimmed vacuoles is allelic to hereditary inclusion body myopathy." Neurology **59**(11): 1689-93.
- Nonaka, I., N. Murakami, et al. (1998). "Distal myopathy with rimmed vacuoles." Neuromuscul Disord **8**(5): 333-7.
- Nonaka, I., N. Sunohara, et al. (1985). "Autosomal recessive distal muscular dystrophy: a comparative study with distal myopathy with rimmed vacuole formation." Ann Neurol **17**(1): 51-9.
- Penner, J., L. R. Mantey, et al. (2006). "Influence of UDP-GlcNAc 2-epimerase/ManNAc kinase mutant proteins on hereditary inclusion body myopathy." Biochemistry **45**(9): 2968-77.
- Rabouille, C., H. Kondo, et al. (1998). "Syntaxin 5 is a common component of the NSF- and p97-mediated reassembly pathways of Golgi cisternae from mitotic Golgi fragments in vitro." Cell **92**(5): 603-10.
- Rens-Domiano, S. and T. Reisine (1991). "Structural analysis and functional role of the carbohydrate component of somatostatin receptors." J Biol Chem **266**(30): 20094-102.

- Saito, F., H. Tomimitsu, et al. (2004). "A Japanese patient with distal myopathy with rimmed vacuoles: missense mutations in the epimerase domain of the UDP-N-acetylglucosamine 2-epimerase/N-acetylmannosamine kinase (GNE) gene accompanied by hyposialylation of skeletal muscle glycoproteins." Neuromuscul Disord **14**(2): 158-61.
- Salama, I., S. Hinderlich, et al. (2005). "No overall hyposialylation in hereditary inclusion body myopathy myoblasts carrying the homozygous M712T GNE mutation." Biochem Biophys Res Commun **328**(1): 221-6.
- Salzberg, S. L., A. L. Delcher, et al. (1998). "Microbial gene identification using interpolated Markov models." Nucleic Acids Res **26**(2): 544-8.
- Schroder, R., G. D. Watts, et al. (2005). "Mutant valosin-containing protein causes a novel type of frontotemporal dementia." Ann Neurol **57**(3): 457-61.
- Schwarzkopf, M., K. P. Knobeloch, et al. (2002). "Sialylation is essential for early development in mice." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(8): 5267-70.
- Sparks, S. E., C. Ciccone, et al. (2005). "Use of a cell-free system to determine UDP-N-acetylglucosamine 2-epimerase and N-acetylmannosamine kinase activities in human hereditary inclusion body myopathy." Glycobiology **15**(11): 1102-10.
- Tucker, W. S., Jr., W. H. Hubbard, et al. (1982). "A new familial disorder of combined lower motor neuron degeneration and skeletal disorganization." Trans Assoc Am Physicians **95**: 126-34.
- Viassolo, V., S. C. Previtali, et al. (2008). "Inclusion body myopathy, Paget's disease of the bone and frontotemporal dementia: recurrence of the VCP R155H mutation in an Italian family and implications for genetic counselling." Clin Genet **74**(1): 54-60.
- Walter, M. C., H. Lochmuller, et al. (2000). "High-dose immunoglobulin therapy in sporadic inclusion body myositis: a double-blind, placebo-controlled study." J Neurol **247**(1): 22-8.
- Watts, G. D., J. Wymer, et al. (2004). "Inclusion body myopathy associated with Paget disease of bone and frontotemporal dementia is caused by mutant valosin-containing protein." Nat Genet **36**(4): 377-81.

Wewer, U. M. and E. Engvall (1996). "Merosin/laminin-2 and muscular dystrophy."  
Neuromuscul Disord **6**(6): 409-18.

Yabe, I., T. Higashi, et al. (2003). "GNE mutations causing distal myopathy with rimmed vacuoles with inflammation." Neurology **61**(3): 384-6.

## 8 ANHANG

### 8.1 Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

A	Adenin
Abb.	Abbildung
ALS	amyotrophe Lateralsklerose
AP	alkalische Phosphatase
aPKC	atypische Proteinkinase C
as	antisense
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
bds.	beidseits
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
C	Cytosin
CK	Kreatinkinase
CMP-NeuAC	Cytidin-5-Monophosphat-N-Acetylneuraminsäure
DGC	Dystrophin-Glycoprotein-Complex
DMRV	distal myopathy with rimmed vacuoles
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)

EDTA	Ethylendiamin-Tetraacetat
EMG	Elektromyogramm
ER	endoplasmatisches Retikulum
ESH	expansile skeletal hyperphosphatasia
FEO	familial expansile osteolysis
FSHD	fazioskapulohumerale Dystrophie
FTD	frontotemporale Demenz
g	Gramm
G	Guanin
<i>GNE</i>	UDP- <i>N</i> -Acetylglucosamin-2-Epimerase/ <i>N</i> -Acetylmannosaminkinase
HIBM	hereditary inclusion body myopathy (hereditäre Einschlusskörpermyopathie)
I	Isoleucin
IBMPFD	inclusion body myopathy associated with Paget's disease of bone and frontotemporal dementia
kb	Kilobase
LGMD	limb girdle muscle dystrophy (Gliedergürtelmuskeldystrophie)
M	Methionin
M.	Morbus
ManNAc	<i>N</i> -Acetylmannosamin
Mg 2+	Magnesiumkationen
MHC	major histocompatibility complex
min	Minute
µl	Mikroliter
ml	Milliliter
mM	Millimol
MRC	Medical Research Council

MRT	Magnetresonanztomographie
MyHC	Myosin heavy chain
Na	Natrium
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NeuAC	<i>N</i> -Acetylneuraminsäure
NF	Nekrosefaktor
nm	Nanometer
PCR	Polymerase-chain-reaction (Polymerasekettenreaktion)
PD	Privatdozent
PDB	Paget`s disease of the bone
pmol	Picomol
RANK	Receptor Activator of Nuclear Factor kappa-B
s	sense
sec	Sekunde
sIBM	sporadic inclusion body myopathy (sporadische Einschlusskörpermyopathie)
SPM	scapulooperoneale Myopathie
<i>SQSTM</i>	Sequestosome
s.u.	siehe unten
s.o.	siehe oben
T	Thymin
TAE	Tris-Acetat-EDTA
Taq Polymerase	<i>Thermus aquaticus</i> Polymerase
T <sub>m</sub>	melting temperature (Schmelztemperatur)
TRAF	tumor necrosis factor receptor associated factor family
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan

U	unit
UDP	Uridindiphosphat
UPS	Ubiquitin-Proteasom-System
UV	ultraviolet
V	Volt
VCP	Valosin-containing Protein
z. B.	zum Beispiel

## 8.2 Primersequenzen

### **GNE Primer, genomisch, für Routinensequenzierung**

Primername	Primersequenz	Tm (°C)	Zielregion	Fragmentlänge (bp)
A1s	TGCTCTGCTCATTATTTCAAACC	60.6	Exon 1	149
A1a	ATTGCAATTTCAATAATAAAGC	53.3		
2s	GTGGTTAAGGACTTGAAACT	54.0	Exon 2	449
2a	GTGACTACTCTAAGGCCAC	49.5		
3s	CTTCAGAGTTGGTGTTAGATTG	54.2	Exon 3	618
3a	CCAAAAGGATTGAAATAGACGG	59.8		
4s	GCACAGACTTAGAGTCTTGC	52.7	Exon 4	335
4a	GAGCAAGATAGGAAGGCAG	55.2		
5s	GTGGGCTATACTTGCCAATG	58.1	Exon 5	357
5a	GCATACCTTATAACAACCTCACG	54.3		
6s	GGTCTAATTATGAGCATAGTAC	47.9	Exon 6	269
6a	GGATGATTAACAGTGATTGTAG	53.2		
7s	CTGAAGTCTCAGTTTCCATTAC	53.3	Exon 7	396
7a	GTTTCTAGTCTTACCTTCCAAC	51.7		
8s	CCTATAGCAGTGTCTAATTTGTC	52.8	Exon 8	308
8a	GCTCAGGCATGCATCACAAG	63.0		
9s	CGTTTGTCTTAGGAGATCTGG	56.6	Exon 9	424
9a	GCAGAGTTGTAACCACCTGAC	57.3		
10s	CTCACATGCCAAAGCTCTGC	62.1	Exon 10	372
10a	GGCTTCAGTGTTTCAGCTGTC	58.6		
11s	GTGAAAAGAAAACACCGTCTTCC	61.2	Exon 11	344
11a	GACACTGCAAAGCACCTGTC	59.5		
12s	CTTTAACATTTCTGCTGCTGGCTC	63.6	Exon 12	461
12a	ATTTCTCTGCCAAAGTCACCTGC	64.0		

## VCP Primer, genomisch, für Routinesequenzierung

Primernamen	Primersequenz	Tm (°C)	Zielregion	Fragmentlänge (bp)
1s 1a	ATTGGCTGTGATCTGCGGGTTGC TCCGTTCTAAGGGAGCCAATCG	71.4 66.6	Exon 1	706
2s 3a	TAGGGACAGCTTCATCTATTAC GTCCTGCCTGTAATACATGG	57.5 55.5	Exon 2+3	664
3s 3a	TTTCTTGCAGTGACTGCAGATA GTCCTGCCTGTAATACATGG	58.7 55.5	Exon 3	372
4s 4a	TCCACCCTGTTCTCCTTCCTCTCTTC GATAAAGATGTTCCAAGGTTTATTCC	68.1 59.6	Exon 4	358
5s 5a	GCCGAGCACCCAGTCCTGACAGTTAC AGGGCACTATCTAATGAGCTTGGC	71.1 64.0	Exon 5	324
6s 6a	GTGGAATGATTTAGAGAACTCAGC CATGCATGAAAACAGTCCCAGG	59.7 64.8	Exon 6	302
7s 7a	AAGTTGCAATCATAAATGTTGCC ATAAGTGCTCCAGTCTATAAGCC	60.3 61.1	Exon 7	401
8-9s 8-9a	CTCTCCAGCCTTGCCTGGTGGCTGTC TGGTTGGTCACTCTAGACAGGACG	75.4 64.9	Exon 8+9	683
10s 10a	TTGAAGCCCTTACAGTGATTGG ACCTAGAAATAAGGCTGCTCCAAC	65.6 61.3	Exon 10	573
11-12s 11-12a	CAGCCTTATTTCTAGGTCCCAAGTC TGCAGCAAATGTGTTGACACCCTG	62.6 69.4	Exon 11+12	656
13s 13a	ATCTGATACCATTGGGTACACC AATAACACTAGGTCTCTCAGACCTC	57.7 56.5	Exon 13	482
14s 14a	GAGGTCTGAGAGACCTAGTGTTATTT AATCTTGTCAGAACTAAAGAGC	57.8 57.4	Exon 14	769
15s 15a	CTGGTACGGAGTGCTCTTTAGTTTC TTCCAACAGCTTCTACTCTCAACTC	61.8 60.5	Exon 15	476
16-17s 16-17a	AGGAGACCAATAAACTGCAGTAATG AGCATTGAGTCAAGTGCAGATGC	60.0 64.0	Exon 16+17	865

## Genbank Zugangsnummern

Gen	genomische Sequenz	mRNA Sequenz
<i>GNE</i>	AL158830	NM_005476
<i>VCP</i>	AC004472	NM_007126

### **8.3 Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denjenigen bedanken, die zum Gelingen dieser Dissertationsarbeit beigetragen haben.

Mein herzlicher Dank gilt Herrn Professor Hanns Lochmüller für die Überlassung dieses Themas, seine fachliche Unterstützung sowie sein reges Interesse am Fortgang dieser Arbeit.

Frau Priv.-Doz. Dr. Maggie Walter danke ich ebenso für die Durchsicht dieser Arbeit und Ihre Unterstützung in fachlichen Fragen sowie die Zuteilung geeigneter Patienten.

Mein besonderer Dank geht vor allem auch an Frau Dr. Dr. Sabine Krause für die Etablierung dieses Forschungsthemas, für die Einarbeitung und Ihre unermüdlichen Unterstützung in wissenschaftlichen und technischen Fragen.

Auch den anderen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe im Labor für Molekulare Myologie möchte ich für ihre freundliche und kompetente Hilfe danken, besonders Herrn Dr. Rolf Stucka, Dr. Juliane Müller und Ursula Klutzny.

## 8.4 Lebenslauf

### Persönliche Daten:

Name: Angelo Aleo  
Geburtstag: 02. November 1979  
Geburtsort: Stuttgart  
Staatsangehörigkeit: italienisch  
Familienstand: ledig

### Schulbildung:

1986 – 1990 Grundschule Stuttgart  
1990 – 1999 Königin-Katharina-Stift Gymnasium, Stuttgart  
1999 Allgemeine Hochschulreife

### Hochschulstudium:

2002 – 2008 Humanmedizin an der LMU-München  
2004 Ärztliche Vorprüfung  
2008 Staatsexamen Humanmedizin

### Wissenschaftliche Tätigkeiten:

2005 Experimentelle Forschung am Genzentrum der LMU-München  
Thema: Identifikation zellulärer Gene und Proteine bei Cytomegalieviren

2005 – 2007 Arbeitsgruppe Prof. Hanns Lochmüller, Friedrich-Baur-Institut an der Neurologischen Klinik der LMU-München, Labor für Molekulare Myologie mit dem Dissertationsthema: Geno- und phänotypische Charakterisierung hereditärer Einschlusskörpermyopathien

---

## 9 EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG

Diese Dissertation wurde selbständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt.

München, den .....

-----  
(Angelo Aleo)

Dissertation eingereicht am: