

**Untersuchungen zur Rolle des Prion-Gens
bei der molekularen Pathogenese
der sporadischen Einschlusskörpermyositis**

Bettina Mendel

2005

Aus dem Friedrich-Baur-Institut
Leitender Arzt: Prof. Dr. D. E. Pongratz
der Medizinischen Fakultät
an der Neurologischen Klinik und Poliklinik
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. Dr. h. c. Th. Brandt

**Untersuchungen zur Rolle des Prion-Gens
bei der molekularen Pathogenese
der sporadischen Einschlusskörpermyositis**

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

vorgelegt von

Bettina Mendel

aus Sangerhausen

2005

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität München

Berichterstatter : Prof. Dr. Hanns Lochmüller

Mitberichterstatter: Prof. Dr. J. Herms
Priv. Doz. Dr. H. Steiner

Mitbetreuung durch die promovierten Mitarbeiter: Priv. Doz. Dr. M. C. Walter

Dekan: Prof. Dr. D. Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 21.04.2005

*Ein Mensch sieht, was vor Augen ist
der Herr aber sieht das Herz an.*

1. Samuel 16,7

***Meinen Eltern
in Dankbarkeit gewidmet***

Publikationen:

- 1.** Lampe J, Grossau G, Reichmann H, Walter MC, **Mendel B**, Lochmüller H, Prion codon 129 homozygosity and sporadic inclusion body myositis. *Neurology* 2001;57:368
- 2.** Durling HJ, Reilich P, Müller-Höcker J, **Mendel B**, Pongratz D, Wallgren-Pettersson C, Gunning P, Lochmüller H, Laing NG, De novo missense mutation in a constitutively expressed exon of the slow alpha-tropomyosin gene TPM3 associated with an atypical, sporadic case of nemaline myopathy. *Neuromuscular Disorders* 2002;12:947-951
- 3.** Thirion C, Stucka R, **Mendel B**, Gruhler A, Jaksch M, Nowak KJ, Binz N, Laing NG, Lochmüller H, Characterization of human muscle type cofilin (CFL2) in normal and regenerating muscle. *European Journal of Biochemistry* 2001;268:3473-3482.
- 4.** Müller-Höcker J, Schäfer S, **Mendel B**, Lochmüller H, Pongratz D Nemaline cardiomyopathy in a young adult: an ultraimmunohistochemical study and review of the literature. *Ultrastructural Pathology* 2000;24:407-416.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	6
1. Einleitung	8
1.1. Einschlusskörpermyositis.....	8
1.1.1. Klinik, Histologie und Genetik	8
1.1.2. Theorien zur Pathogenese der s-IBM.....	10
1.2. IBM und Neurodegenerationsproteine	11
1.3. IBM und Prion.....	12
1.4. IBM und α B-Crystallin	14
2. Zielsetzung	15
3. Material und Methoden	16
3.1. Patienten und Untersuchungsmaterial.....	16
3.2. DNA-Extraktion	17
3.3. mRNA-Extraktion aus Myotuben	17
3.4. PCR	17
3.4.1. Standardprotokoll und Reaktionsbedingungen	18
3.4.2. Modifikationen	19
3.4.3. Reverse-Transcriptase-PCR (RT-PCR).....	19
3.4.4. PCR-primer	20
3.5. Agarose-Gel-Elektrophorese und Gel-Extraktion.....	22
3.6. Restriktionsverdau.....	22
3.7. Sequenzanalyse	22
4. Ergebnisse	23
4.1. Methionin/Valin-Polymorphismus.....	23
4.2. Prion-Gen	24

4.2.1. Sequenzanalyse des Prion-Gens.....	24
4.2.2. H140R-Mutation bei einem Patienten mit s-IBM.....	25
4.2.2.1. Klinik und Histologie des Patienten.....	25
4.2.2.2. Sequenzierung und Restriktionsverdau.....	27
4.2.2.3. RT-PCR.....	28
4.2.2.4. Konservierung von Histidin am Kodon 140.....	29
4.2.3. Sequenzanalyse des α B-Crystallin-Gens.....	29
5. Diskussion.....	30
5.1. Methionin/ Valin Polymorphismus.....	30
5.2. Prion-Gen Sequenzanalyse.....	33
5.3. α B-Crystallin Sequenzanalyse.....	35
6. Zusammenfassung und Ausblick.....	37
7. Literatur.....	39
8. Anhang.....	47
Verzeichniss der verwendeten Abkürzungen.....	47
Lebenslauf.....	48
Danksagung.....	49

1. Einleitung

1.1. Einschlusskörpermyositis

1.1.1. Klinik, Histologie und Genetik

Die Einschlusskörpermyositis (englisch: inclusion body myositis, IBM) ist eine chronisch progressive, entzündliche Muskelerkrankung, die erstmals 1978 von Karpati und Carpenter (Carpenter et al., 1978) beschrieben wurde und als sporadische (s-IBM) oder hereditäre IBM (h-IBM) vorliegen kann. Die Erkrankung tritt meist nach dem 50. Lebensjahr auf und betrifft Männer dreimal häufiger als Frauen (Dalakas et al., 1991; Sekul et al., 1993).

Klinisch findet man neben einer proximalen Schwäche schon initial auch eine Beteiligung distaler Muskelgruppen, vor allem Fingerbeuger- und Fußhebermuskulatur, sowie asymmetrisch angeordnete Muskelatrophien mit Betonung des Quadriceps und der Armflexoren (Abb. 1) (Lindberg et al., 1994; Dalakas et al., 1995). Begleitend findet man häufig eine Abschwächung der tiefen Sehnenreflexe und eine Schluckstörung (Dalakas et al., 1996).



Abb. 1

Unterarmmuskulatur mit
typischer Atrophie der Flexoren

Der klinische Phänotyp ist sehr variabel. So gibt es bei einigen IBM-Patienten zu Beginn der Erkrankung auch ein mehr proximales Muskelbefallsmuster der oberen und unteren Extremität (Lindberg et al., 1994). Elektrophysiologisch zeigt sich ein charakteristisches myopathisch-neurogenes Mischmuster (Pouget et al., 1987; Yoy et al., 1990). Eine Beteiligung der peripheren Nerven mit Reduktion der sensiblen Nervenleitgeschwindigkeit wird in einigen Fällen beobachtet (Lindberg et al., 1990).

Typische histologische Befunde sind sog. „rimmed vacuoles“ mit eosinophilen zytoplasmatischen Einschlüssen. Immunhistochemisch lassen sich bei der h-IBM und s-IBM innerhalb dieser Einschlüsse verschiedene Proteine nachweisen, die auch bei verschiedenen neurodegenerativen Erkrankungen auftreten, wie Ubiquitin, β -Amyloid Protein, β -Amyloid Vorläuferprotein, Apolipoprotein E, α 1-Antichymotrypsin, Presenilin-1, hyperphosphoryliertes Tau und Prion-Protein (Askanas et al., 1993, 1995, 1998).

Histologisch findet sich bei der s-IBM, nicht aber bei der h-IBM, eine peri- und endomysiale Entzündungsreaktion mit Invasion zytotoxischer CD8⁺ Zellen in nicht-nekrotischen Muskelfasern (Fyhr et al., 1996). Die Diagnose wird elektronenmikroskopisch anhand von typischen filamentären Einschlüssen mit einem Durchmesser von 15-18 nm in Kern und Zytoplasma gesichert (Figarella-Branger et al., 1992).

Molekulargenetisch findet sich eine erhöhte Frequenz des Apolipoprotein E4 Allels bei Patienten mit IBM im Vergleich zur Kontrollgruppe (Garlepp et al., 1995).

Die hereditären Formen der Erkrankung (eine autosomal-rezessive und zwei autosomal-dominante Formen) wurden bislang zwei verschiedenen Genloci zugeordnet. Eine autosomal-rezessive Form (IBM2) wurde zu Chromosom 9p1-q1 (Argov et al., 1997) gemapt. Ursächlich hierfür ist eine Mutation im GNE-Gen (UDP-N-acetylglucosamin-2-epimerase/N-acetylmannosaminekinase; OMIM 603824) (Eisenberg et al., 2001). Interessant ist hier die ungewöhnliche Verteilung der Paresen mit Aussparung der Quadrizepsmuskulatur. Patienten nahöstlicher Abstammung zeigen dabei meist eine homozygote Missense-Mutation und betroffene Familien anderer ethnischer Herkunft unterschiedliche compound-heterozygote Mutationen im GNE-Gen (Eisenberg et al., 2001; Askanas et al., 1998). Auch bei der Nonaka-Myopathie findet man Mutationen im GNE-Gen (Askanas et al., 1998, Kayashima et al., 2002).

Die autosomal-dominante Form (IBM3) wurde Chromosom 17p13.1 zugeordnet und wird durch Mutationen im Myosin-Heavy-Chain-IIa-Gen (MYHC2A oder MYH2; OMIM 160740) verursacht (Martinsson et al., 1999). Klinisch zeigt sich eine Myopathie mit Kontrakturen, Ophthalmoplegie und den für IBM typischen „rimmed vacuoles“.

Die s-IBM hat sich insgesamt als schwer therapierbar erwiesen. Immunsuppressiva und Steroide haben in der Regel keine positive Auswirkung auf den Krankheitsverlauf (Barohn et al., 1995). Eine den Verlauf der Krankheit stabilisierende Wirkung wurde aber durch die intravenöse Gabe hochdosierter Immunglobuline erreicht (Dalakas et al., 1997; Walter et al., 2000).

1.1.2. Theorien zur Pathogenese der s-IBM

Die Pathogenese der Einschlusskörpermyositis ist bis jetzt noch nicht eindeutig geklärt, es existieren verschiedene Hypothesen.

Die Ähnlichkeit der elektronenmikroskopisch sichtbaren mikrotubulären Filamente zu den Nukleokapsiden der Paramyxoviren führte zu der Hypothese einer persistierenden slow-virus-Mumps-Infektion (Chou 1967, 1986), die jedoch zwischenzeitlich widerlegt werden konnte.

Eine autoimmune Genese der IBM wird durch die Tatsache gestützt, dass CD8⁺ T-Zellen in den pathologischen Prozess involviert sind und man bei der s-IBM typischerweise inflammatorische Veränderungen findet. So konnten in den betroffenen Muskeln neben aktivierten T-Lymphozyten auch Zytokine, wie die Interleukine IL-1 α und β , IL-6, INF- γ , Lymphotoxin und tumor necrosis factor (TNF- α) nachgewiesen werden (Lundberg 2000; Megens-deLetter et al., 1999). Diese These der autoimmunen Genese wird auch durch die häufige Assoziation mit anderen Autoimmunopathien, z.B. Sjögren-Syndrom, SLE, Diabetes mellitus und einer peripheren Neuropathie gestützt (Lotz et al., 1989; Koffmann et al., 1998).

Auch die Expression von Fas, einem Mitglied der TNF-Rezeptor-Familie auf Muskelzellen und von Fas-Liganden auf infiltrierenden T-Zellen und Makrophagen wurde bei IBM-Patienten beobachtet, obwohl die Rolle der apoptotischen Aktivität in betroffenen Muskelfasern weniger klar ist (Behrens et al., 1997; Hohlfeld et al., 1997).

Die s-IBM ist weiterhin mit MHC-1-Klasse- und DR-Antigenen assoziiert, deren Ausprägung eine Prädisposition für die Entwicklung der Erkrankung darstellt. Eine der stärksten Assoziationen besteht zwischen s-IBM und DR3 sowie C4A*Q0, welche innerhalb der MHC Genloci nahe der MHC-Klasse-2 Region liegt (Garlepp et al., 1994, Kok et al., 1999).

Eine Akkumulation von Apolipoprotein 4 und Variationen in der D-loop Region der mtDNA bei Patienten mit s-IBM (Garlepp et al., 1995; Kok et al., 2000) sowie eine auffällige Akkumulation von einsträngigem DNA-Bindungsprotein in den Skelettmuskelfasern lässt die Vermutung auf eine Störung auf nukleärer Ebene zu (Nalbantoglu et al., 1994). Auch verschiedene andere ätiologische Faktoren wie mitochondriale Deletionen, Stickstoffmonoxid induzierter oxidativer Stress und abnorme Anhäufung von Alzheimer-typischen Proteinen werden diskutiert (Tawil et al., 2002).

Die Akkumulation von Ubiquitin, β -Amyloid-Protein (A β), β -Amyloid-Vorläuferprotein (β APP), Apolipoprotein E, α 1-Antichymotrypsin, Presenilin-1, hyperphosphoryliertem Tau und Prion-Protein in den pathognomonischen „rimmed vacuoles“ rücken die s-IBM in die Nähe neurodegenerativer Erkrankungen (Askanas et al., 1993, 1994, 1995, 1998).

Eine andere Theorie zur Pathogenese der s-IBM stützt sich auf die Beobachtung der Akkumulation des auch bei M. Alzheimer in Astrozyten und Mikrogliazellen überexprimierten Proteins α B-Crystallin (α B-C). So wurde eine vermehrte Expression des Chaperon-Proteins α B-Crystallin in zahlreichen, pränekrotischen Muskelfasern von s-IBM-Patienten nachgewiesen (Banwell et al., 2000).

Durch bislang nicht identifizierte Stressoren ausgelöste, erhöhte α B-Crystallin Expression könnte zum einen zu einer Triggerung des Immunsystems führen, zum anderen aber auch bei entsprechender genetischer Prädisposition für die vermehrte Umfaltung zahlreicher, neurodegenerations-assoziiierter Proteine verantwortlich sein. Diese Faktoren könnten in Kombination zur Degeneration von Skelettmuskelfasern führen.

1.2. IBM und Neurodegenerationsproteine

Einige Proteine, die mit neurodegenerativen Erkrankungen assoziiert sind, findet man in auffälliger Häufung auch in den Vakuolen von betroffenen Skelettmuskelfasern bei Patienten mit s-IBM und h-IBM (Askanas et al., 1993, 1994, 1995, 1998).

Außerdem ist bekannt, dass IBM und M. Alzheimer einige gemeinsame pathobiochemische Charakteristika besitzen; Amyloid- β -Protein und Amyloid- β -Vorläuferprotein finden sich normalerweise im Gehirn von Patienten mit Alzheimer-Demenz und akkumulieren dort in den pathognomonischen Plaques.

Die s-IBM ist die einzige Muskelerkrankung, die durch eine pathologische Akkumulation von β -Amyloid und β -Amyloid-Vorläuferprotein außerhalb des Zentralnervensystems charakterisiert ist. Interessanterweise spielen diese Proteine und/oder durch Vorläufer-Proteolyse entstandene β -Amyloid-haltige Fragmente keine Rolle bei anderen Myopathien. Dies führt zu der Vermutung, dass pathologische Veränderungen von $A\beta$ und/oder β APP bei der molekularen Pathogenese der s-IBM beteiligt sein könnten.

Eine Überexprimierung von β APP führt bei transgenen Mäusen zur Entwicklung IBM-typischer Veränderungen im Skelettmuskel (Fukuchi et al., 1998). Direkter Gentransfer von β APP in kultivierte, normale, menschliche Skelettmuskelfasern mittels eines adenoviralen Vektors induziert ähnliche morphologische und immunhistochemische Veränderungen wie sie bei der IBM gefunden werden (Askanas et al., 1996).

Des Weiteren findet man bei sporadischer und hereditärer IBM die gleichen Anhäufungen von intrazellulären Tubulofilamenten aus hyperphosphoryliertem Tau (Askanas et al., 1994) und weiteren neurodegenerations-assoziierten Proteinen, wie Ubiquitin, Apolipoprotein E, α -Synuclein, Presenilin-1 und Prion-Protein (Askanas et al., 1993, 1994, 1995, 1998), wie bei Patienten mit sporadischem und hereditärem M. Alzheimer im Hirngewebe. Diese Ergebnisse lassen eine pathogenetische Verwandtschaft zwischen M. Alzheimer und s-IBM vermuten.

Vice versa ist ein Patient mit neurodegenerativer Erkrankung beschrieben, bei dem einige der für IBM typischen Veränderungen zu finden waren. So zeigte die Muskelbiopsie eines Gerstmann-Sträussler-

Scheinker-Patienten mit einer P102L Mutation im Prion-Gen eine Myopathie mit „ragged red fibers“ und Vakuolenbildung (Hsiao et al., 1989; Rosenthal et al., 1976).

Von Alzheimer-Patienten ist bekannt, dass sie eine erhöhte Frequenz des Apolipoprotein E 4 Allel Genotyps (ApoE 4/4) aufweisen. Dies konnte in geringerem Maße auch für IBM Patienten, jedoch nicht für Patienten mit anderen entzündlichen Muskelerkrankungen nachgewiesen werden (Garlepp et al., 1995).

ApoE wird auch in abnormalen Muskelfasern von IBM-Patienten akkumuliert (Mirabella et al., 1996). Möglicherweise kann ein ApoE 4/4 Genotyp neben anderen Faktoren zur Entwicklung einer IBM disponieren.

Ebenso findet sich eine vermehrte Expression von Rezeptoren der LDL-Familie und eine Anhäufung von freiem Cholesterin in vakuolisierten Muskelfasern bei IBM-Patienten (Jaworska-Wilczynska et al., 2002). Da bekannt ist, dass Lipoprotein-Rezeptoren und Cholesterin eine bedeutende Rolle in der Prozessierung von β APP, der A β -Produktion und der Tau-Phosphorylierung spielen, impliziert deren Vorhandensein in regenerierenden und nekrotischen Muskelfasern bei IBM eine mögliche pathogenetische Rolle (Frears et al., 1999; Bodovitz et al., 1996; Avdulov et al., 1997; Mizuno et al., 1999).

1.3. IBM und Prion

Das Prion-Protein ist ein extrazelluläres Sialo-Glykoprotein, das über einen Glykophosphatidylinositol (GPI)-Anker mit der Zellmembran verbunden ist und bei allen Säugetieren vorkommt.

Die Tatsache, dass es zu den hochkonservierten Proteinen gehört, mit einer über 90% Sequenzhomologie zwischen den verschiedenen Säugetierklassen und selbst bei Hühnern vorhanden ist, unterstreicht die bedeutende physiologische Rolle dieses Proteins (Sparkes et al., 1986; Gabriel et al., 1992).

Beim Menschen findet man Prion-Protein vor allem in Neuronen, aber auch in verschiedenen anderen Geweben, darunter Herz- und Skelettmuskulatur. Das humane Prion-Gen befindet sich auf Chromosom 20pter-p12.

Nach der Transkription und verschiedenen co- und posttranslationalen Modifikationen besteht das Prion-Protein aus 209 Aminosäuren.

Unterschiedliche Prion-Glykosilierungsmuster werden mit unterschiedlichen klinischen Verlaufsformen der Creutzfeld-Jakob-Erkrankung (CJD) korreliert (Parchi et al., 1999). Eine verminderte N-Glykosylierung von zellulärem Prion-Protein (PrP^c) beeinflusst dessen Stabilität und wurde sowohl bei Fataler-Familiärer-Insomnie (FFI) als auch bei CJD in Zellen mit Expression von D178N PrP^c-Mutanten gefunden (Petersen et al., 1996). Zudem ist in der Regel eine Strukturveränderung von α -Helices-reichem PrP^c zu pathogenem, Protease-resistentem PrP^{sc} (Scrapie Prion), welches reich an β -Faltblatt-Strukturen ist, für die Pathogenität des Prion-Proteins entscheidend (Mastrianni et al., 1999).

Das bei s-IBM im Skelettmuskel der Patienten vorhandene Prion-Protein wurde biochemisch als zelluläres PrP charakterisiert und ist damit nicht mit der pathologischen PrP^{sc}-Isoform identisch (Askanas et al., 2001; Zanusso et al., 2001).

Es existiert außerdem eine transmembrane Form des PrP^c, TMPrP genannt, die ebenfalls in die Neurodegeneration bei übertragbaren Prionen-Erkrankungen involviert ist (Hedge et al., 1998).

Die genaue Funktion des Prion-Proteins ist noch unklar. Es existieren verschiedene Hypothesen, die eine mögliche protektive Funktion gegen oxidativen Stress (Milhavel et al., 2000), die Regulation der Kupferhomöostase (Brown et al., 1998; Kretzschmar 1999), Involvierung in den Zell-Adhäsions-Prozess (Gauczynski et al., 2001) und Beteiligung an der Signaltransduktion (Mouillet-Richard et al., 2000) beinhalten. Neueste Studien zeigen, dass auch aktivierte Komponenten des Komplementsystems bei humanen Prion-Erkrankungen eine Rolle spielen (Kovacs et al., 2004).

Mehrere neurodegenerative Erkrankungen des Menschen, wie CJD, die Gerstmann-Sträussler-Scheinker-Erkrankung (GSS) und die Fatale-Familiäre-Insomnie (FFI) wurden außerdem mit dem Nachweis von Mutationen im Prion-Gen in Verbindung gebracht.

Es ist bekannt, dass das Prion-Protein eine Region aufweist, die in der Lage ist, divalente Metallionen, vor allem Kupfer, aber auch Zink zu binden. Diese 5-Oktapeptid-Region mit der Consensus-Sequenz PHGGGWGQ ist die am höchsten konservierte Region des Prion-Gens (PRNP) bei Säugetieren (Brown et al., 1997; Hornshaw et al., 1995).

Es konnte gezeigt werden, dass die Fähigkeit Kupfer zu binden die Aktivität der zellulären antioxidativen Enzyme Cu²⁺/Zn²⁺-Superoxiddismutase beeinflusst und damit die zelluläre Widerstandsfähigkeit gegenüber oxidativem Stress (Brown et al., 1998) abnimmt. Störungen der Kupferhomöostase wiederum haben sowohl im Tiermodell, als auch beim Menschen Dysfunktionen im ZNS zur Folge. So entwickeln mit kupferbindenden Reagenzien behandelte Mäuse neuropathologische Veränderungen, die denen bei Prionen-Erkrankungen ähneln (Pattison et al., 1971; Kimberlin et al., 1974). Beim Menschen konnten bei Amyotropher Lateralsklerose und auch bei M. Alzheimer Störungen im Kupfertransportstoffwechsel nachgewiesen werden (Waggoner et al., 1999).

Der Nachweis der molekularen Pathomechanismen dieser Erkrankungen wird aber dadurch erschwert, dass Zellkulturuntersuchungen an normalen oder pathologisch veränderten humanen Neuronen nicht oder nur begrenzt möglich sind (Scott et al., 1992, Schätzl et al., 1997).

Untersuchungen an Prion-transgenen Mäusen konnten zeigen, dass diese eine schwere Myopathie entwickeln (Westaway et al., 1994). In histologischen Untersuchungen der Skelettmuskulatur von s-IBM Patienten konnte ebenfalls das Prion-Protein nachgewiesen werden. Dort akkumuliert es in den pathognomonischen „rimmed vacuoles“. Diese Tatsache hat zu der Vermutung geführt, dass es sich auch bei der s-IBM um eine Prion-assoziierte Erkrankung handeln könnte.

Genetische Analysen hinsichtlich verschiedener Polymorphismen zeigen eine Rolle des Prion-Gens als prädisponierenden Faktor für die Entwicklung einer s-IBM. So korreliert das Vorhandensein einer s-IBM mit dem vermehrten Auftreten einer Methionin/Methionin-Homozygotie am Kodon 129 des Prion-Gens.

Dem gegenüber ist die Mehrzahl der gesunden Kontrollpersonen im Kodon 129 Methionin/Valin-heterozygot (Lampe et al., 1999).

1.4. IBM und α B-Crystallin

Die α -Crystalline gehören zur großen Familie der “small heat-shock-proteins” (sHSPs), die Proteine mit einem Molekulargewicht unter 30 000 Da umfassen. Es gibt zwei verschiedene α -Crystallin-Gene, α A- und α B-Crystallin. Das Gen für α B-Crystallin ist auf Chromosom 11q22.3-q23.1 lokalisiert und kodiert für 175 Aminosäuren. Es besteht eine 58%ige Sequenzhomologie zu α A-Crystallin.

α B-Crystallin ist neben α A-Crystallin eine der Hauptkomponenten der Augenlinse, wird aber auch in Oligodendrozyten und Astrozyten und im Herz- und Skelettmuskel exprimiert.

Bei verschiedenen neurodegenerativen Erkrankungen, wie M. Parkinson, der Creutzfeld-Jakob-Erkrankung (Iwaki et al., 1992; Renkawek et al., 1992) und M. Alzheimer (Lowe et al., 1992; Shinohara et al., 1993) wird α B-Crystallin pathologischerweise auch von Neuronen exprimiert.

α B-Crystallin ist bekannt dafür, Zellen in Situationen von thermischem oder oxidativem „Stress“ gegen Proteindegradation zu schützen. Es ist assoziiert mit verschiedenen Typen von Intermediärfilamenten, wie Desmin, einem Hauptintermediärfilament der glatten und quergestreiften Muskulatur, sowie der Herzmuskulatur (Bennardini et al., 1992).

Außerdem ist α B-Crystallin involviert in Prozesse des zellulären Wachstums, der Transkription und Differenzierung und hilft bei der Faltung von Proteinen in höhere Strukturen.

Wahrscheinlich wird auch die Umfaltung des Prion-Proteins in die pathologische Proteinase-resistente Form durch zelluläre Chaperone wie α B-Crystallin katalysiert (Schirmer et al., 1997).

Des Weiteren ist α B-Crystallin als negativer Regulator der myogenetischen Apoptose involviert in der Entwicklung und Differenzierung von Skelettmuskelzellen (Merideth et al., 2002).

Eine Untersuchung auf eine mögliche Überexpression von α B-Crystallin in Muskeln von s-IBM-Patienten ergab eine verdächtige Anhäufung in zahlreichen, histologisch betroffenen Muskelfasern, darüber hinaus aber auch in mikroskopisch noch normalen Fasern. Bei Patienten mit Polymyositis oder bei Normalkontrollen konnte dagegen keine Überexpression von α B-Crystallin gefunden werden (Banwell et al., 2000).

2. Zielsetzung

Übergeordnetes Ziel dieser Arbeit ist es, zur Aufklärung der molekularen Pathogenese der Einschlusskörpermyositis beizutragen.

Die Ätiologie und Pathogenese der sporadischen Einschlusskörpermyositis ist bisher noch nicht eindeutig geklärt. Es existieren dazu verschiedene Hypothesen, bei denen eine Autoimmungnese oder die Assoziation mit neurodegenerativen Erkrankungen favorisiert wird.

Neuere Untersuchungen haben ergeben, dass bestimmte genetische Konstellationen (Genotypen) zwar nicht als alleinige Ursache der sporadischen IBM angesehen werden können, aber dennoch wichtige Risikofaktoren (genetische Prädispositionen) darstellen, aus deren Untersuchung Rückschlüsse auf die molekulare Pathogenese gezogen werden können (Lampe et al., 1999). Insbesondere Untersuchungen des Prion-Gens sowie der Nachweis von Prion-Protein in den Einschlüssen der Muskelfasern von s-IBM-Patienten haben die Hypothese einer genetisch prädisponierten, degenerativen Erkrankung des Muskels unterstützt („Alzheimer-Erkrankung des Muskels“) (Askanas et al., 1993, 1994, 1995, 1998).

Außerdem wurde vor kurzem gezeigt, dass das Chaperon-Protein α B-Crystallin in zahlreichen, pränekrotischen Muskelfasern von s-IBM-Patienten nachweisbar ist (Banwell et al., 2000). Dennoch wurden bisher eine Reihe von Fragen zur Rolle von Prion und anderen Degenerations- und Stress-assoziierten Proteinen in der molekularen Pathogenese der s-IBM nicht geklärt.

Dazu wurden folgende Aspekte bearbeitet:

- Ein Ziel dieser Arbeit besteht darin, durch Untersuchungen zum Methionin/Valin–Polymorphismus am Kodon 129 herauszufinden, inwieweit sich eine statistisch signifikante Häufung eines bestimmten Genotyps bei Patienten mit s-IBM im Vergleich zur Normalpopulation findet.
- Ein weiteres Ziel ist es, durch PCR und Sequenzanalyse des Prion-Gens bei Patienten mit s-IBM zu untersuchen, ob Mutationen vorliegen, die sich in weiterführenden Untersuchungen als ursächlich an der Pathogenese der Erkrankung beteiligt herausstellen könnten.
- Des Weiteren sollen Sequenzuntersuchungen zur Gensequenz des α B-Crystallin durchgeführt werden, um Mutationen zu finden, die möglicherweise die Chaperon-Aktivität des α B-Crystallin herabsetzen und somit Einfluss auf Stabilität und Faltung des Prion-Proteins haben könnten.

3. Material und Methoden

3.1. Patienten und Untersuchungsmaterial

Untersucht wurden insgesamt 37 Patienten mit sporadischer Einschlusskörpermyositis (s-IBM).

Das Manifestationsalter der s-IBM lag zwischen 22 und 75 Jahren.

Die Diagnosen wurden klinisch, elektromyografisch und histologisch gesichert.

Nr.	Biopsie im Jahr	Patient	Alter	Zygotie am Kodon 129	Histologie-Befunde	EM-Befunde
1	1996	K.A.	78	M / M	vereinzelte Vakuolen	filamentäre Einschlüsse
2	1999	H.A.	34	M / M	vakuoläre Degeneration	filamentäre Einschlüsse
3	1989 1993, 1994	M.B.	49	M / M	“rimmed vacuoles”	filamentäre Einschlüsse
4	1996	S.B.	67	M / V	“rimmed vacuoles”	kein EM-Beweis einer IBM
5	1999	K.B.	74	M / V	“rimmed vacuoles”	kein EM-Beweis einer IBM
6	1996	H.B.	81	M / V	zahlreiche Vakuolen	filamentäre Aggregate
7	1996	F.B.	69	M / V	zahlreiche Vakuolen	filamentäre Einschlüsse
8	1999	A.B.	69	M / M	keine spezifischen Hinweise	fokale Filamentansammlungen
9 *	1995/1998	L. F.v.B.	78	M / M	vereinzelte Vakuolen	kein EM-Beweis einer IBM
10	1999	R.D.	71	M / M	“rimmed vacuoles”	kein EM-Beweis einer IBM
11	1998	K.-H.E.	69	M / V	“rimmed vacuoles”	kein EM-Beweis einer IBM
12	2000	L.F.	52	M / M	vereinzelte Vakuolen	kein EM-Beweis einer IBM
13	1997	M.G.	69	M / V	vereinzelte Vakuolen + Infiltrate	filamentäre Einschlüsse
14	1995	I.H.	67	M / M	vakuoläre Faserdegenerationen	tubuläre Formationen
15	1989	F.H.	65	M / M	vakuoläre Faserdegenerationen	fokale Filamentansammlungen
16	1999	P.-H.J.	65	M / M	“rimmed vacuoles”	fokale Filamentansammlungen
17	1997	H.K.	84	M / M	vereinzelte Vakuolen	kein EM-Beweis einer IBM
18	1995	E.K.	83	M / M	“rimmed vacuoles”	kein EM-Beweis einer IBM
19	1998	G.K.	69	M / V	“rimmed vacuoles”	tubuläre Formationen
20	1998	S.L.	62	M / M	einige Vakuolen	filamentäre Einschlüsse
21	2000	H.L.	59	V / V	“rimmed vacuoles”	kein EM-Beweis einer IBM
22	1995	G.M.	67	M / M	vakuoläre Faserdegenerationen	filamentäre Einschlüsse
23	2000	L.M.	62	M / M	“rimmed vacuoles”	filamentäre Einschlüsse
24	2000	P.M.	79	M / V	vereinzelte Vakuolen	kein EM-Beweis einer IBM
25	1996	H.P.	61	M / M	zahlreiche Vakuolen	filamentäre Einschlüsse
26	2001	K.-D..R.	67	M / M	“rimmed vacuoles”	kein EM-Beweis einer IBM
27	1998	B.S.	49	V / V	“rimmed vacuoles”	filamentäre Einschlüsse
28	1999	M.S.	67	M / V	“rimmed vacuoles”	fokale Filamentansammlungen
29	1997	G.S.	83	M / V	vakuoläre Faserdegenerationen	kein EM-Beweis einer IBM
30	2000,2002	U.S.	83	M / M	vereinzelte Vakuolen	kein EM-Beweis einer IBM
31	1999	F.T.	69	M / V	vakuoläre Faserdegenerationen	filamentäre Einschlüsse
32	1998	E.T.	72	M / V	“rimmed vacuoles”	filamentäre Einschlüsse
33	2000	M.W.	82	M / M	“rimmed vacuoles”	filamentäre Einschlüsse
34	1998	N.W.	59	M / M	“rimmed vacuoles”	kein EM-Beweis einer IBM
35	2001	A.W.	66	M / V	vereinzelte Vakuolen	kein EM-Beweis einer IBM
36	1995	W.W.	73	M / M	vereinzelte Vakuolen	kein EM-Beweis einer IBM
37 *	1997	N.Z.	28	M / M	vereinzelte Vakuolen	filamentäre Einschlüsse

* nur Zygotie am Kodon 129 im *MaeII*-Verdau untersucht

Tabelle1

3.2. DNA-Extraktion

Zur Gewinnung genomischer DNA aus Leukozyten und deren molekulargenetischer Untersuchung wurden jeweils 10 ml EDTA-Blut entnommen. Die Blutentnahme erfolgte im Rahmen von diagnostischen Routineuntersuchungen mit dem Einverständnis der Patienten und in Übereinstimmung mit der gültigen Version der Deklaration von Helsinki.

Die Extraktion wurde mit Hilfe des „Wizard Genomic DNA Purification Kit“ der Fa. Promega und des „Qiagen Blood and Tissue Culture DNA Extraction Kit“ der Fa. Qiagen entsprechend den Herstellerangaben durchgeführt.

3.3. mRNA-Extraktion aus Myotuben

Die zur Extraktion von mRNA kultivierten Muskelproben wurden aus Restmaterial diagnostischer Muskelbiopsieentnahmen gewonnen und waren bis zur Kultivierung im Rahmen dieser Arbeit als primäre Myoblastenkulturen in der Muskelbank am Friedrich-Baur-Institut gelagert worden. Die weitere Verwendung dieses Materials erfolgte mit dem Einverständnis der Patienten und in Übereinstimmung mit der gültigen Version der Deklaration von Helsinki.

Im 37 °C-Brutschrank mit 5% CO₂-Atmosphäre wurden die Myoblasten unter mehrfachem Wechsel von skeletal muscle medium der Fa. PromoCell kultiviert.

Nach Fusion der Myoblasten zu Myotypen wurden diese vom Boden der Petrischalen gelöst und zum Schutz vor RNAsen bis zur sofortigen Extraktion auf Eis gelagert.

Extrahiert wurde nach dem Rneasy Mini Protokoll zur Isolation von Gesamt-RNA mit Hilfe des RneasyMini-Kits der Fa. Qiagen.

Das Eluat mit der enthaltenen RNA wurde bei –20°C aufbewahrt.

Zur Erhöhung der Konzentration der mRNA wurde diese im Anschluss mit einer Lösung aus 3% Kaliumacetat in 70% Ethanol ausgefällt.

3.4. PCR

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) als Methode zur Amplifizierung definierter Abschnitte genomischer DNA (template) wurde nach einem Protokoll von Mullis (Mullis et al. 1990) durchgeführt.

3.4.1. Standardprotokoll und Reaktionsbedingungen

Folgende Reagenzien wurden in dieser Arbeit für die durchgeführten PCRs verwendet:

- Nukleotide-Mix: dNTP- Set, 2,5 mmol, Fa. MBI Fermentas
- Reaktions-Puffer: - Thermopol-Puffer, New England Biolabs
- Expand Long Template PCR System, Roche Diagnostics
- *Taq* DNA- Polymerase: Boehringer Mannheim
- steriles Aqua dest
- primer: siehe 3.4.4

Der 50 µl Ansatz der durchgeführten PCR entsprach folgendem Protokoll:

- Reaktionspuffer: 5 µl
- sense-primer: 1 µl
- antisense-primer: 1 µl
- *Taq*-Polymerase: 1,5 µl
- dNTP-Mix: 5 µl
- genomische DNA: 1 µl
- steriles Aqua dest: 35,5 µl

Das Standard-PCR-Programm sah folgendermaßen aus:

Schritt	Temperatur	Zeit in min	Zyklusanzahl
1. DNase-Inaktivierung Initial-Denaturierung	95 °C	5	1
2. DNA-Denaturierung	95 °C	1	35
3. Annealing	56 °C	1	35
4. Extension	72 °C	1	35
5. Final Extension	72 °C	7	1

Tabelle 2

Für alle PCRs wurden ein PCR-Thermocycler (Mastercycler personal) der Fa. Eppendorf und ein PE-Thermocycler der Fa. Perkin Elmer (Applied Biosystems, Foster City, California) benutzt.

3.4.2. Modifikationen

Durch Verwendung von Reaktionspuffern mit unterschiedlichen pH-Werten, Zugabe von Mg^{2+} oder Dimethylsulfoxid wurden die Reaktionsbedingungen optimiert.

Annealing-Temperaturen wurden entsprechend der PCR-Produkt-Ausbeute variiert.

Damit auch bei sehr geringen DNA-Ausgangsmengen ausreichende Konzentrationen an PCR-Produkten erzielt werden konnten, wurde das Standard-Programm wie folgt modifiziert:

Schritt	Temperatur	Zeit in min	Zyklusanzahl
1. DNase-Inaktivierung			
Initial-Denaturierung	94 °C	2	1
2. Denaturierung	94 °C	0,5	5
3. Annealing	50 °C	1	5
4. Extension	72 °C	5	5
5. Denaturierung	94 °C	0,25	35
6. Annealing	50 °C	0,5	35
7. Extension	72 °C	2	35
8. Final Extension	72 °C	5	1

Tabelle 3

3.4.3. Reverse-Transcriptase-PCR (RT-PCR)

Die RT-PCR dient der Herstellung einer cDNA. Als Matrize für das Reverse-Transkriptase-Enzym zur Herstellung des DNA-Erststrangs diente die aus kultivierten Muskelzellen gewonnene Gesamt-RNA. In der vorliegenden Arbeit wurde eine cDNA für PRNP und α B-Crystallin hergestellt.

Folgendes PCR-Protokoll wurde für die Erststrangsynthese der cDNA verwendet:

Gesamt-RNA : 1-5 μ l (in Abhängigkeit von der RNA-Konzentration)

Primer: 1 μ l

Der Ansatz wurde mit sterilem Aqua dest auf 5 μ l aufgefüllt, gemischt und die RNA unter Schütteln für 2 min bei 70 °C denaturiert. Im Anschluss wurde der Ansatz ebenfalls unter Schütteln für 2 min auf Eis gekühlt und erneut gemischt.

Der Ansatz wurde mit folgenden Reagenzien auf 10 µl aufgefüllt:

M-MuLV RT-Puffer (MBI Fermentas):	2 µl
DTT (20 mM, MBI Fermentas):	1 µl
Nukleotid-Mix (MBI Fermentas):	1 µl
M-MuLV-Reverse-Transkriptase (MBI Fermentas):	1 µl

Unter mehrfachem Schütteln wurde der DNA-Erststrang 90 min bei 42 °C synthetisiert, der Ansatz anschliessend mit 20 µl Tris-EDTA-Puffer aufgefüllt und zur Zerstörung der Reversen Transkriptase 7 min auf 72 °C erhitzt.

3.4.4. PCR-primer

Die für die PCR verwendeten primer wurden, basierend auf den veröffentlichten Sequenzen der Genbank (www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi) entworfen und durch die Abteilung von Dr. G. Arnold, Genzentrum LMU München synthetisiert.

Folgende primer wurden verwendet:

1. prion-PCR

P129s : 5'- TCA AGG AGG TGG CAC CCA CA - 3'

P129a : 5'- CGT CGG TCT CGG TGA AGT TC - 3'

Das PCR-Produkt der Prion-PCR stellt ein 338 bp-Fragment von Exon 3 des Prion-Gens dar, welches den M/V-Polymorphismus (Kodon 129) enthält. Die Annealing-Temperatur betrug 56 °C.

2. pnp2-PCR

pnp2s : 5'- ACC CAC AGT TTT CTG TAA GAG - 3'

pnp2a : 5'- CCT CTG GAT CAA GAG CTT GT - 3'

Das bei einer Annealing-Temperatur von 50 °C entstehende PCR-Produkt hat eine Länge von 413 bp und enthält Exon 2 des Prion-Gens.

3. pnp3-PCR

pnp5s : 5'- ATA TGG GAC TCT GAC GTT CT - 3'

pnp3a : 5'- GAT GGT GAA AAC AGG A - 3'

Das PCR-Produkt hat eine Länge von 925 bp und bestand aus dem codierenden Anteil von Exon 3 des Prion-Gens.

4. H140R- RT-PCR

P129a: 5'- CGT CGG TCT CGG TGA AGT TC - 3'

5.H140R-PCR

-für 5'- Ende:

H140R-1s: 5'- CGC AAG CTT GAA CTC TGA CAT TCT CCT CTT C - 3'

P129a: 5'- CGT CGG TCT CGG TGA AGT TC - 3'

-für Mittelteil: primer der prion-PCR

-Für 3'- Ende:

H140R-3s: 5'- CCA TGG ATG AGT ACA GCA AC - 3'

H140R-3a: 5'- AGA CAC CAC CAC TAA AAG GG - 3'

Das entstandene PCR-Produkt hat eine Länge von 319 bp.

6.αB-Crystallin-RT-PCR

Für die Erststrangsynthese der RT-PCR wurde ein Oligo(dT)-primer benutzt.

7. αB-Crystallin-PCR

αBCrys : 5'- ACC CCT CAC ACT CAC CTA GCC A - 3'

αBCrya : 5'- CCC GGA CGG GAA TCG TAA TTA T - 3'

Die primer für diese PCR wurden anhand der öffentlich zugänglichen mRNA-Sequenz für αB-Crystallin (Genbank accession number 4503056) erstellt.

Das bei einer Annealing-Temperatur von 55°C entstandene PCR-Produkt ist ein 661bp grosses Fragment, welches alle 3 codierenden Exons des αB-Crystallin-Gens enthält.

8. αBC3-PCR

αBC-3s: 5'- ATG CCT GAG TTC TGG GCA G - 3'

αBC-3a: 5'- GCC CTT AGC ATT AAT AAG C - 3'

Das bei einer Annealing-Temperatur von 50°C entstandene PCR-Produkt hat eine Länge von 379 bp und stellt das dritte codierende Exon des αB-Crystallin-Gens dar.

3.5. Agarose-Gel-Elektrophorese und Gel-Extraktion

Zur elektrophoretischen Auftrennung der in der PCR entstandenen PCR-Produkte wurde ein 2% Agarose-Gel verwendet. Nach Ausschneiden der gewünschten PCR-Fragmente wurde eine Gelextraktion mittels „QIAquick Gel Extraktions Kits“ der Fa. Qiagen nach Herstellerprotokoll durchgeführt.

Die Proben-DNA wurde dann bei -20°C aufbewahrt.

3.6. Restriktionsverdau

Zum Nachweis des M129V-Polymorphismus wurde als Restriktionsenzym *MaeII* (*TaiI*) der Fa. MBI Fermentas verwendet.

Der Gesamt-Ansatz von 25 μl bestand aus:

- 2 μl Restriktionsenzym (*MaeII*)
- 15 μl DNA
- 2 μl Buffer R+ (im Restriktionsenzym-Kit enthaltener Tris-HCL-Puffer)
- 6 μl Aqua dest

Dieser Ansatz wurde 2 h bei 65°C im Wasserbad inkubiert.

Bei heterozygotem Vorhandensein der Schnittstellen (M/V) entstehen zwei 225 bp und 113 bp große Fragmente, sowie ein ungeschnittenes Fragment von 338 bp Länge. Fehlt die Schnittstelle bei Methionin/Methionin-Homozygotie (M/M), findet man ausschließlich ein ungeschnittenes 338 bp großes Fragment.

3.7. Sequenzanalyse

Die entstandenen PCR-Produkte wurden nach Aufreinigung in sense- und antisense-Richtung sequenziert. Dies erfolgte zum einen durch die Fa. Medigenomix, München-Martinsried und durch die Abteilung von Herrn Dr. Blum am Genzentrum München. Verwendet wurden dabei Sequenziergeräte der Fa. Applied Biosystems (Modelle: Prism XL 96 bzw. 377) und fluoreszenzmarkierte Didesoxy-Terminatoren. Die Sequenzen wurden mit den entsprechenden Sequenzen (für das Prion-Gen: Genbank-Zugangsnummer gi 11079225; für das αB -Crystallin-Gen: Genbank-Zugangsnummer gi 4503056) online über den Server des National Center for Biotechnology Information (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) verglichen und auf potentielle Mutationen und Polymorphismen untersucht.

4. Ergebnisse

In dieser Arbeit wurden bei allen 37 Patienten die Zygote am Kodon 129 und bei 35 der insgesamt 37 s-IBM Patienten die Sequenzen unterschiedlicher, möglicherweise an der Pathogenese der s-IBM beteiligter Gene auf Mutationen und Polymorphismen untersucht.

4.1. Methionin/Valin-Polymorphismus

Beim Methionin/Valin-Polymorphismus führt ein A zu G Austausch in der ersten Position des Kodon 129 zum Ersatz von Methionin durch Valin. Dadurch kommt es zur Entstehung einer neuen Restriktionsenzymstichstelle.

In der vorliegenden Arbeit wurden 37 Patienten mit s-IBM auf Heterozygotie für Methionin oder Valin am Kodon 129 des PRNP Gens untersucht, sowie 57 Kontrollen (Normalpopulation).

Nach Verdau mit dem Restriktionsenzym *MaeII* (*Tail*), welches die DNA beim Vorhandensein der Sequenz für Valin im Kodon 129 an dieser Stelle schneidet, findet man bei M/M-Homozygotie in der Agarosegelelektrophorese ungeschnittene Fragmente mit einer Größe von 338 bp (Abb. 2; Spur 1, 2, 4). Bei M/V-Heterozygotie findet man sowohl ein ungeschnittenes 338 bp großes Fragment, als auch zwei geschnittene Fragmente der Größe 225 bp und 113 bp (Abb. 2; Spur 3)

Liegt eine V/V-Homozygotie vor, so zeigen sich 225 bp und 113 bp große geschnittene Fragmente (Abb. 2; Spur 5).

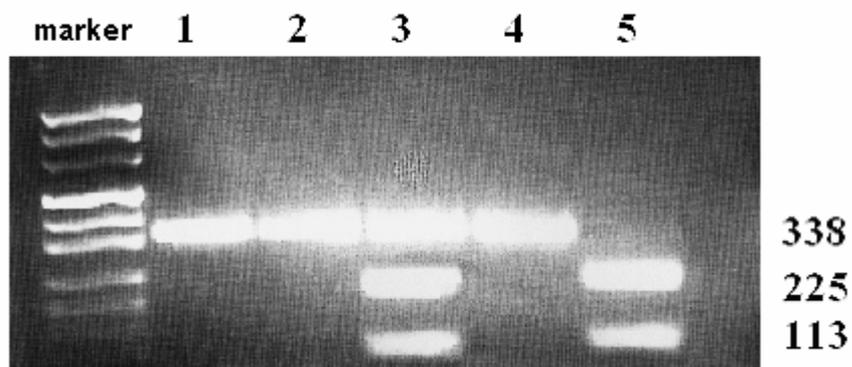


Abb. 2

Agarosegelelektrophorese nach Restriktionsenzymverdau

Kodon 129 des Prion-Gens bei s-IBM Patienten im Vergleich zum Normalkontroll-Kollektiv

	Anzahl	M/M (in %)	M/V (in %)	V/V (in %)
s-IBM Patienten	37	22 (59,5)	13 (35,1)	2 (5,4)
gesunde Kontrollen	57	23 (40,3)	29 (50,9)	5 (8,8)

Tabelle 4

59,5% der Patienten waren homozygot für Methionin. Bei den Kontrollen waren es nur 40,3%. In dieser Vergleichsgruppe gab es mit 50,9% ein Überwiegen der Met/Val-Heterozygotie am Kodon 129. Es zeigt sich, dass bei s-IBM-Patienten der Genotyp Methionin/Methionin am Kodon 129 im Vergleich zum Genotyp Methionin/Valin mit einer schwachen Signifikanz überwog. Unterschiede in der Frequenz wurden mit dem χ^2 -Test untersucht; dabei ergab sich $\chi^2 = 2,91$ und $p = 0,088$.

4.2. Prion-Gen

4.2.1. Sequenzanalyse des Prion-Gens

Mit Hilfe der pnp3-PCR wurde bei 33 der 35 sequenzierten s-IBM-Patienten untersucht, inwieweit Mutationen und Polymorphismen im gesamten codierenden Bereich des dritten Exons vorhanden waren. Die Sequenzanalyse erstreckte sich dabei auf den Bereich von Kodon 1 bis Kodon 254 (stopcodon). Dieser Abschnitt beinhaltet die kupferbindende 5-Octapeptid-Region und die flankierende intronische Sequenz am 5'-Ende des dritten Exons.

Die zur Sequenzierung benutzten PCR-Produkte der Patienten hatten eine Länge zwischen 536 bp und 798 bp.

Die Sequenzen wurden mit der öffentlich zugänglichen Wildtyp-Prion-DNA-Sequenz (Genbank accession number 19079225) verglichen.

Dabei stellte sich heraus, dass die Mehrzahl der Patienten keine Mutation bzw. keinen Polymorphismus im untersuchten Genabschnitt hatten. Bei einem Patienten fand sich eine H140R Mutation in diesem Bereich, welche unter 4.2.2. gesondert beschrieben wird.

Bei drei Patienten zeigte sich ein schon bekannter Polymorphismus A117A (Wu et al., 1987) in der dritten Position des Kodon 117, der aber keinen Aminosäureaustausch zur Folge hat. Hierbei ist Adenin durch Guanin ersetzt worden (Abb. 3).

Alle drei Patienten waren Methionin/Valin heterozygot.

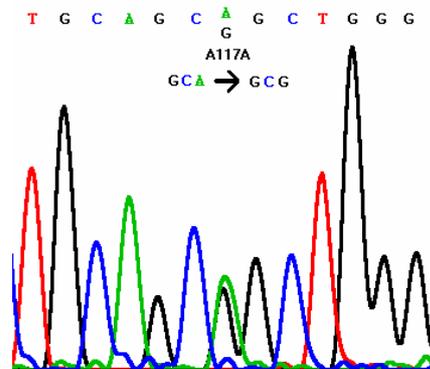


Abb. 3

Sequenzabbildung des A117A- Polymorphismus

Bei 33 der 35 sequenzierten Patienten wurde zusätzlich mittels der pnp2-PCR das nichtcodierende Exon 2 mitsamt der flankierenden intronischen Sequenzen untersucht.

Es zeigte sich bei keinem der untersuchten Patienten eine Mutation oder ein Polymorphismus.

4.2.2. H140R-Mutation bei einem Patienten mit s-IBM

4.2.2.1. Klinik und Histologie des Patienten

Der in dieser Arbeit beschriebene 67-jährige männliche Patient leidet seit seinem 55. Lebensjahr an einer langsam progressiven, asymmetrischen und vor allem die proximale Extremitätenmuskulatur betreffenden Muskelschwäche und -atrophie.

Außerdem bestand bei ihm eine dilatative Kardiomyopathie, ein subrenales Aneurysma und ein Diabetes mellitus.

Die neuropsychologische Untersuchung war unauffällig. In der Familie des Patienten sind keine Muskel- oder neuropsychiatrischen Erkrankungen bekannt.

Die Kreatinkinase (CK) war bei der Aufnahmeuntersuchung leicht erhöht (235 U/l; normal < 80U/l), bei nachfolgenden Testungen aber im Normalbereich. Die elektromyografische Untersuchung zeigte ein typisches neurogen-myogenes Mischmuster.

Unter einer Therapie mit Steroiden über 3 Jahre zeigte sich eine weitere Progression der Erkrankung. Nach Umstellung auf intermittierende hochdosierte intravenöse Immunglobulingabe konnte die Progression verlangsamt werden.

Die endgültige Diagnose einer s-IBM wurde im Alter von 59 Jahren durch eine Muskelbiopsie im rechten M. biceps brachii gestellt. Hier fand sich lichtmikroskopisch eine nekrotische Myopathie mit inflammatorischen Infiltraten (Abb. 6) und den in verschiedenen histologischen Färbungen (H&E, NADH tetrazolium reductase, Gomori trichrome, van Gieson) sichtbaren und für die s-IBM typischen „rimmed vacuoles“ mit eosinophilen zytoplasmatischen Einschlüssen (Abb. 4).



Abb. 4

Muskelbiopischer Nachweis entzündlicher Infiltrate (Pfeile) und „rimmed vacuoles“ (Sterne) innerhalb der Muskelfasern in HE- Färbung

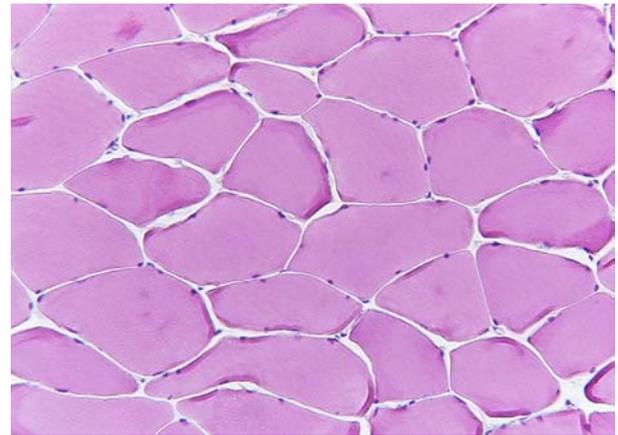


Abb. 5

Normale Muskelfasern in HE-Färbung

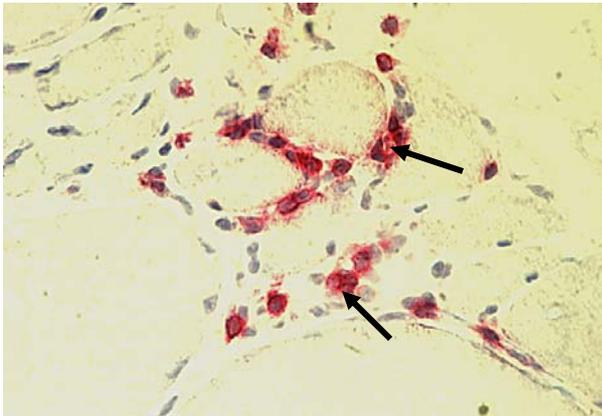


Abb. 6

Immunohistochem. Nachweis von CD4-Lymphozyten in inflammatorischen Infiltraten (Pfeile) um pränekrotische Muskelfasern in APPAP-Färbung

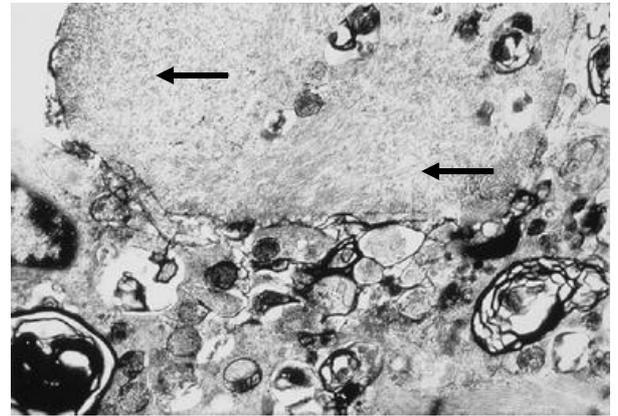


Abb. 7

Elektronenmikroskopische Aufnahme des Inneren sog. „rimmed vakuoles“, die autophagischen Vakuolen entsprechen. Außerdem lassen sich filamentäre Strukturen (Pfeile) nachweisen

Elektronenmikroskopisch wurde die s-IBM des Patienten durch den Nachweis der 15-18 nm Filamente gesichert.

4.2.2.2. Sequenzierung und Restriktionsverdau

Die Sequenzierung des PCR-Produktes ergab einen A zu G Basenaustausch in Position 419 des Prion-Gens (PRNP) des Patienten (Abb. 8, Bild A).

Diese heterozygote Missense-Mutation hat eine Histidin zu Arginin Substitution im Kodon 140 (H140R) des PRNP zur Folge und wurde weder bei den 34 anderen sequenzierten s-IBM-Patienten noch im Kontrollkollektiv von 57 Normalpersonen gefunden (Abb. 8, Bild B).

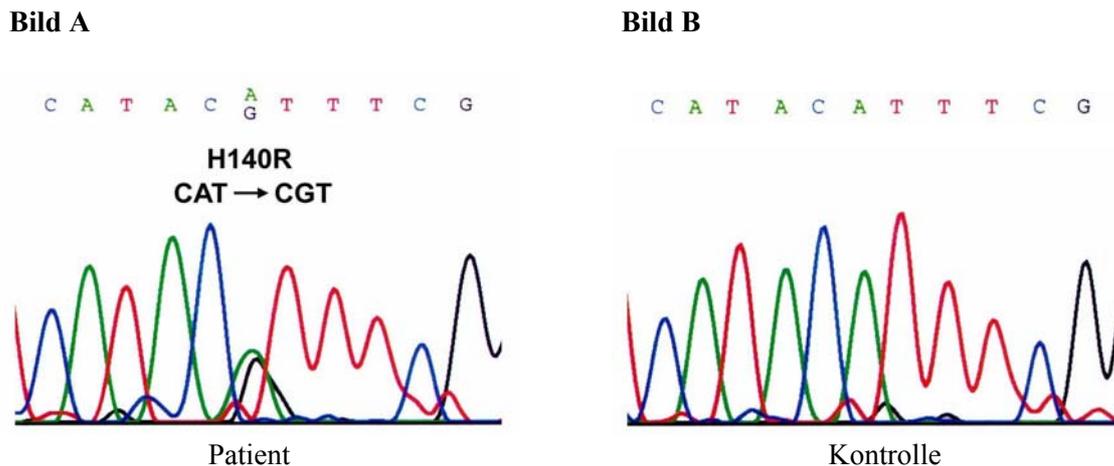


Abb. 8

Sequenzabbildung der H140R Mutation des Patienten im Vergleich zu einer gesunden Kontrolle

Die 45-jährige Tochter des Patienten ist ebenfalls heterozygote Trägerin der H140R Mutation. Drei genetisch untersuchte mütterliche Verwandte (zwei Tanten, ein Cousin) und ein väterlicher Verwandter (Halbruder) erwiesen sich als negativ bezüglich der H140R Mutation.

Ein Restriktionsverdau des PCR-Produktes mit *MaeII* zeigt bei M/V-Heterozygotie neben einer ungeschnittenen 338 bp Bande (Methionin am Kodon 129) zwei 113 bp und 225 bp große Fragmente, (Valin am Kodon 129) (Abb. 9, Spur 2).

Bei M/M-Homozygotie fehlt die Restriktionsenzymstichstelle, man findet nur ungeschnittene Fragmente (Abb. 9, Spur 3). Bei V/V-Homozygotie dagegen entstehen zwei Banden der Größe 113 bp und 225 bp (Abb. 9, Spur 4).

Der s-IBM-Patient in dieser Arbeit ist M/M homozygot. Die H140R Mutation führt aber zur Entstehung einer zusätzlichen Schnittstelle für *MaeII*, so dass neben dem ungeschnittenen Fragment mit 338 bp zwei neue Fragmente von 147 bp und 191 bp Größe entstehen (Abb. 9, Spur 1).

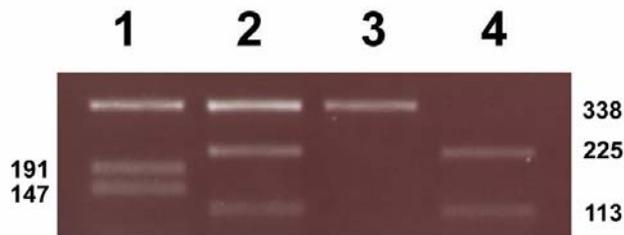


Abb. 9

Agarosegelelektrophorese nach *MaeII*- Verdau

Die H140R Mutation konnte im *MaeII*-Verdau weder bei den 36 anderen untersuchten s-IBM Patienten noch bei 57 Kontrollpersonen gefunden werden.

4.2.2.3. RT-PCR

Um die präferentielle Expression des PrP-Allels im Skelettmuskel des s-IBM-Patienten (Abb.10, Spur 2) zu untersuchen, wurden eine RT-PCR und ein anschließender Restriktionsverdau mit *MaeII* im Vergleich zu einem normalen Skelettmuskel (Abb.10, Spur 1) durchgeführt.

Während die mutierte cDNA vom Restriktionsenzym in zwei Fragmente der Größe 171 und 127 bp geschnitten wurde, blieb die wildtyp cDNA ungeschnitten.

Die Stärke der beiden geschnittenen Banden im Patientenmuskel im Vergleich zu der ungeschnittenen Bande erlaubte Rückschlüsse auf den Expressionsgrad. Die Resultate zeigten, dass sowohl das mutierte Allel H140R, als auch das wildtyp-Allel gleichermaßen exprimiert werden.

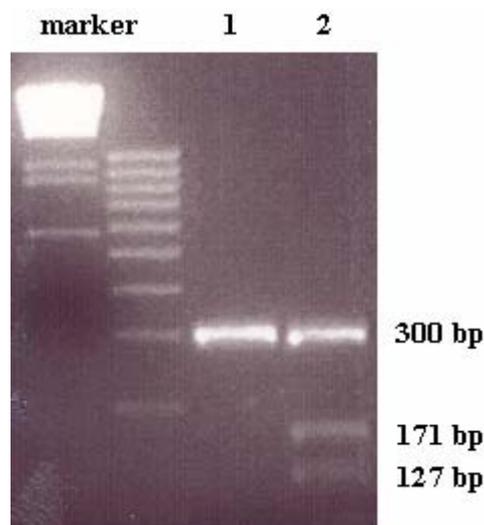


Abb. 10

Restriktionsverdau mit *MaeII*

4.2.2.4. Konservierung von Histidin am Kodon 140

	H140R																				
	▽																				
Mensch	L	G	S	A	M	S	R	P	I	I	H	F	G	S	D	Y	E	D	R	Y	Y
Gorilla	L	G	S	A	M	S	R	P	I	I	H	F	G	S	D	Y	E	D	R	Y	Y
Gibbon	L	G	S	A	M	S	R	P	I	I	H	F	G	S	D	Y	E	D	R	Y	Y
Orang-Utan	L	G	S	A	M	S	R	P	I	I	H	F	G	N	D	Y	E	D	R	Y	Y
Kaninchen	L	G	S	A	M	S	R	P	L	I	H	F	G	N	D	Y	E	D	R	Y	Y
Schwein	L	G	S	A	M	S	R	P	L	I	H	F	G	S	D	Y	E	D	R	Y	Y
Ziege	L	G	S	A	M	S	R	P	L	I	H	F	G	N	D	Y	E	D	R	Y	Y
Schaf	L	G	S	A	M	S	R	P	L	I	H	F	G	N	D	Y	E	D	R	Y	Y
Maus	L	G	S	A	M	S	R	P	M	I	H	F	G	N	D	W	E	D	R	Y	Y
Goldhamster	L	G	S	A	M	S	R	P	M	M	H	F	G	N	D	W	E	D	R	Y	Y
Ratte	L	G	S	A	M	S	R	P	M	L	H	F	G	N	D	W	E	D	R	Y	Y

Abb. 11
Aminosäuresequenz verschiedener Säugetierspezies

Der Vergleich der Sequenz der Aminosäuren verschiedener Säugetierspezies zeigt, dass Histidin an der Position 140 hochkonserviert ist.

4.2.3. Sequenzanalyse des α B-Crystallin-Gens

Mit Hilfe der α BC-3-PCR wurde bei 24 der 35 sequenzierten s-IBM Patienten die codierende Region (Exon 3) des α B-Crystallin-Gens untersucht. Das PCR-Produkt hat eine Länge von 379 bp. Keiner der Patienten zeigte dabei eine Abweichung von der Wildtyp-Sequenz.

Bei sieben der 35 untersuchten s-IBM Patienten war Material aus Routinemuskelbiopsien zur Anlage von Myoblastenkulturen vorhanden. Die nach RT-PCR entstandene α B-Crystallin-cDNA wurde mit der Wildtyp-cDNA-Sequenz (Genbank accession gi 181075) verglichen. Dabei stellte sich heraus, dass bei der Mehrzahl der Patienten keine Mutationen oder Polymorphismen im Bereich des α B-Crystallin-Gens vorhanden waren.

Ein männlicher Patient zeigte einen Adenin zu Guanin Basenaustausch im Kodon 55 in Exon 1, der aber keinen Aminosäureaustausch zur Folge hat.

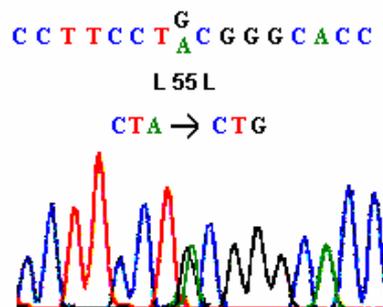


Abb. 12
Sequenzabbildung des A zu G Basenaustausches

5. Diskussion

5.1. Methionin/ Valin Polymorphismus

Es ist bekannt, dass der Genotyp am Kodon 129 in Verbindung mit anderen Mutationen bzw. Polymorphismen des humanen Prion-Gens einen Einfluss hat auf die phänotypische und histopathologische Ausprägung verschiedener Prion-Erkrankungen.

Nachdem eine Mutation mit Austausch der Aminosäure Asparaginsäure durch Asparagin am Kodon 178 (D178N) des humanen Prion-Gens als molekulargenetische Ursache der familiären Form der CJD beschrieben wurde, fand sich dieselbe Mutation auch als Ursache der Fatal-Familial-Insomnia (FFI) (Goldfarb et al., 1992).

Als genotypische Grundlage für die unterschiedliche phänotypische Ausprägung der D178N Mutation zeigte sich die Abhängigkeit von der Zygote am Kodon 129 der mutierten Prion-Protein Allele. Valin in Position 129 in Verbindung mit der D178N Mutation führt zur Entstehung von CJD, wohingegen Methionin am Kodon 129 zusammen mit D178N zur Ausprägung als FFI führt (Goldfarb et al., 1992). Ebenso besteht ein Zusammenhang zwischen der Phenylalanin-zu-Serin-Mutation in Position 198 (F198S) beim Gerstmann-Sträussler-Scheinker-Syndrom (GSS) und dem Vorhandensein einer Valin/Valin-Homozygotie am Kodon 129 hinsichtlich des früheren Manifestationsalters bei Val/Val-Homozygotie, im Vergleich zu Patienten mit F198S Mutation und Met/Val-Heterozygotie (Dlohy et al., 1992).

Auch die Zygote am Kodon 129 allein hat einen Einfluss auf die Prädisposition und klinische Ausprägung humaner Prionen-Erkrankungen.

Eine Homozygotie für Methionin oder Valin am Kodon 129 des Prion-Gens stellt nicht nur einen Risikofaktor für das Auftreten der sporadischen Form, der iatrogenen, sowie der neuen Variante der Creutzfeld-Jacob-Erkrankung (vCJD) dar (Palmer et al., 1991; Deslys et al., 1994; Laplanche et al., 1994; Salvatore et al., 1994; Schulz-Schaeffer et al., 1996; Hill et al., 1997), sondern beeinflusst auch das neuropathologische Läsionsmuster, sowie Dauer und Schwere der Erkrankung (Parchi et al., 1997, 2000). Biochemische Studien zeigten, dass Methionin in Position 129 des Prion-Gens eher eine Umfaltung des Prion-Proteins in die pathologische β -Faltblattstruktur nach sich zieht als Valin in derselben Position (Petchanikowa et al., 2001).

Auch bei der Entstehung der s-IBM erweist sich die Zygote am Kodon 129 hinsichtlich der genetischen Prädisposition als wichtiger Risikofaktor.

In verschiedenen Studien wurde die Frequenz des Vorkommens von Methionin und/oder Valin am Kodon 129 bei Patienten mit s-IBM im Vergleich zur Normalpopulation untersucht. Dabei zeigte sich, dass der Anteil der M/V-Heterozygotie in der Normalbevölkerung sowohl in Metaanalysen verschiedener Länder, als auch in gepoolten Studien überwog.

Zygotie am Kodon 129 in verschiedenen Normalpopulationen:

Populationen	Anteil der M/M-Homozygotie	Anteil der M/V-Heterozygotie	Anteil der V/V-Homozygotie	Referenz
Kaukasier	43%	48,7%	8,3%	Zimmermann et al, 1999
Frankreich	36,2%	53,6%	10,1%	Deslys et al; 1994
Deutschland	41,9%	44,6%	13,5%	Schulz-Schaeffer, et al 1996
Europa	39%	50%	11%	Alperovitch A, et al 1999

Tabelle 5

Dagegen liegt bei Patienten mit sCJD der Anteil der Methionin/Methionin-Homozygotie in den verschiedenen Studien höher als der Anteil der heterozygoten Patienten. Es zeigte sich eine Korrelation zwischen dem Vorhandensein einer Homozygotie für Methionin am Kodon 129 des Prion-Gens und dem Auftreten der sCJD.

Alle bis zu diesem Zeitpunkt untersuchten Patienten mit der neuen Variante der CJD waren ebenfalls homozygot für Methionin (Hill et al., 1997).

Verteilung der Zygotie bei CJD-Patienten in verschiedenen Ländern:

Populationen	M/M	M/V	V/V	Reference
CJD Patienten Großbritannien	83%	9%	9%	Windl O 1996
CJD Patienten Frankreich	56%	16%	28%	Hauw JJ 2000
CJD Patienten Italien	80,6%	16,13%	3,23%	Salvatore M 1994
CJD Patienten Deutschland	72,7%	12%	14,8%	Windl O 1999
CJD Patienten Europa	70%	16%	13%	Alperovitch A 1999

Tabelle 6

Im Vergleich zur Normalpopulation überwiegt bei Patienten mit s-IBM dagegen der Anteil derer, die Methionin homozygot sind. Die absolute Frequenz der Methionin/Methionin Homozygotie liegt in den verschiedenen europäischen Kontroll-Populationen zwischen 37% und 45% (Deslys et al., 1994; Lampe et al., 1999; Salvatore et al., 1994; Windl et al., 1996).

Die in dieser Arbeit auf einen Polymorphismus am Kodon 129 untersuchten 37 Patienten mit s-IBM waren in 59,5% der Fälle homozygot für Methionin.

Population	M/M	M/V	V/V	Reference
s-IBM Patienten (n=37) diese Studie	22(59,5%)	13(35,1%)	2(5,4%)	
s-IBM Patienten (n=22) Deutschland	14 (63%)	7 (31%)	1 (4%)	Lampe J, 1999
Kontrollgruppe aus fünf europäischen Studien (n=398)	156 (39,2%)	198 (49,8%)	44 (11,1%)	Lampe J, 1999

Signifikanz: s-IBM Patienten (Lampe J, 1999) versus Kontrollgruppe derselben Studie und gepoolte Kontrollen von fünf europäischen Studien: $p=0,023$ (getestet mit χ^2 -Test)

Tabelle 7

In einer weiteren Studie zur Signifikanz der Methionin-Homozygotie mit 41 s-IBM Patienten (Oth et al., 2000) ergab sich lediglich ein $p=2,497$ und damit keine eindeutige Signifikanz für das Überwiegen der M/M-Homozygotie gegenüber des Vorhandenseins von M/V am Kodon 129.

Im Rahmen dieser Studie konnte aber gezeigt werden, dass die Homozygotie für Methionin am Kodon 129 des humanen Prion-Gens bei s-IBM im Vergleich zur Methionin/Valin-Heterozygotie signifikant häufiger auftritt, als in der gesunden Kontrollpopulation. Im χ^2 -Test ergab sich eine schwache Signifikanz mit $p=0,088$.

Möglicherweise stellt die Methionin/Methionin-Homozygotie am Kodon 129 einen prädisponierenden Faktor für bestimmte Erkrankungen dar. Ähnlich wie bei der Creutzfeld-Jacob-Erkrankung (CJD) könnte somit auch für Patienten, die homozygot für Methionin sind ein erhöhtes Risiko, an s-IBM zu erkranken, bestehen.

5.2. Prion-Gen Sequenzanalyse

Humanes zelluläres Prion-Protein (PrP^c) wird nicht nur in neuronalem Gewebe, sondern auch in Leukozyten, Herz- und Skelettmuskel exprimiert (Bendheim et al., 1992).

Neben der Erkenntnis, dass Prionen-Erkrankungen in erster Linie degenerative Erkrankungen des ZNS sind, mehren sich die Anzeichen dafür, dass auch die Skelettmuskulatur mitbetroffen sein kann. So fand man bei Patienten mit Gerstmann-Sträussler-Scheinker-Syndrom (GSS) mit einer Prolin zu Leucin Mutation am Kodon 102 des Prion-Gens (P102L) eine Myopathie mit den für IBM typischen "ragged-red fibers" und Muskelfasern mit Vakuolen (Rosenthal et al., 1976).

Obwohl die physiologische Rolle des Prion-Proteins (PrP) noch nicht vollständig geklärt ist, zeigt sich, dass es einen Zusammenhang zwischen der Expression von PrP in verschiedenen Geweben und der Entstehung und Ausprägung von Prionen-Erkrankungen und IBM gibt.

So findet man in den Skelettmuskelfasern von Patienten mit s-IBM und h-IBM Vakuolen („rimmed vacuoles“), in denen sich immunhistochemisch sowohl neurodegenerations-assoziierte Proteine, als auch das Prion-Protein nachweisen lassen (Askanas et al., 1993, 1995, 1998). Gleichzeitig ist die Expression von Prion-mRNA in betroffenen Muskelfasern hochreguliert (Sarkozi et al., 1994). Im gesunden menschlichen Skelettmuskel dagegen kann das Prion-Protein in geringen Mengen lediglich im Bereich der neuromuskulären Endplatte nachgewiesen werden (Gohel et al., 1999). Das bisher in diesen Vakuolen von s-IBM-Patienten akkumulierte Prion-Protein war immer zelluläres Prion-Protein (PrP^c) (Askanas et al., 2001; Zanusso et al., 2001), welches die gleiche Primärstruktur wie die pathologische Prion-Isoform PrP^{sc} besitzt, sich aber in der dreidimensionalen Struktur eindeutig unterscheidet (Prusiner 1996). Dagegen wurde bei einem Patienten, der sowohl an CJD, als auch an einer s-IBM erkrankt war, in den Vakuolen der Skelettmuskelfasern ein Prion-Protein nachgewiesen, welches biochemisch als PrP^{sc} charakterisiert wurde (Kovacs et al., 2004). Ebenso fand sich in einer Kohorte von Schweizer sCJD-Patienten bei 8 von 32 Patienten PrP^{sc} im Skelettmuskel (Glatzel et al., 2004). Wie auch in der vorliegenden Arbeit gezeigt, fanden sich dort keine krankheits-assoziierten Mutationen im PRNP. Interessanterweise stellte sich nach Untersuchung der Zygote am Kodon 129 heraus, dass die Mehrheit der Patienten mit PrP^{sc} im Muskel homozygot für Methionin waren (Glatzel et al., 2003). Möglicherweise stellt auch hier die M/M-Homozygotie am Kodon 129 einen prädisponierenden Faktor für die zusätzliche Affektion des Skelettmuskels durch PrP^{sc} dar.

Die daraus resultierende Vermutung, dass es sich bei der s-IBM um eine Prionen-assoziierte Erkrankung handeln könnte, führte zu der Fragestellung, inwieweit Veränderungen in der Gensequenz des im Muskel gefundenen Prion-Proteins kausal an der Pathogenese der s-IBM beteiligt sind.

Gestützt wird diese These auch durch verschiedene tierexperimentelle Ergebnisse. So entwickeln an Scrapie erkrankte Schafe myostis-ähnliche myopathische Veränderungen (Beck et al., 1964; Bosanquet et al., 1956; Hülland et al., 1958) und bei Rotwild fand sich eine chronic-wasting-disease. Auch im Tiermodell bei Prion-transgenen Mäusen konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression von

PRNP neben den bekannten zentralnervösen Veränderungen zur Entwicklung einer nekrotisierenden Myopathie in glatter Muskulatur und Skelettmuskulatur führt, die bislang nicht molekular charakterisiert wurde, histologisch und ultrastrukturell aber einer IBM ähnelt (Westaway et al., 1994).

In dieser Arbeit wurden deshalb bei allen 35 s-IBM Patienten der codierende Bereich und die flankierenden intronischen Sequenzen des Prion-Gens auf Mutationen und Polymorphismen untersucht. Dabei fand sich bei drei der 35 s-IBM Patienten (8,6%) der schon bekannte Polymorphismus A117A, der bei ca.10 % der Population vorhanden ist (Wu et al., 1987). Diese „stille“ Mutation im Kodon 117 geht mit einer Substitution von Adenin durch Guanin einher, die jedoch zu keinem Aminosäureaustausch führt. Des Weiteren zeigte sich bei einem Patienten mit klinisch und histologisch gesicherter s-IBM eine zuvor noch nicht beschriebene heterozygote H140R-Mutation. Diese führt über einen A zu G Austausch zu einem Ersatz der Aminosäure Histidin durch Arginin. Dieser Aminosäureaustausch fand sich weder bei 57 Normalkontrollen, noch bei den anderen in dieser Arbeit untersuchten 34 s-IBM-Patienten.

Die untersuchte 45-jährige Tochter dieses Patienten trägt ebenfalls die H140R-Mutation, bislang ohne die typischen Symptome der IBM, möglicherweise aufgrund ihres noch zu geringen Alters. Alle weiteren untersuchten Familienmitglieder erwiesen sich als negativ in Bezug auf H140R. Anhand von RT-PCR und Restriktionsverdau konnte gezeigt werden, dass sowohl das mutierte Allel als auch das wildtyp-Allel gleichermaßen exprimiert werden.

Diese Mutation stellt keinen häufigen Polymorphismus dar und ist aufgrund der Lage des Aminosäureaustausches in einer innerhalb der Säugetierspezies hochkonservierten Region des PRNP möglicherweise nicht neutral hinsichtlich der Funktion des Prion-Proteins (Billeter et al., 1997).

Derzeit lässt sich noch kein eindeutiger kausaler Zusammenhang zwischen der hier beschriebenen Mutation und der s-IBM herstellen. Diese Ergebnisse führen zu dem Schluss, dass die PRNP-Sequenz allein wohl keinen Aufschluss über pathogenetische Ursachen der s-IBM liefern kann. Es ist nicht auszuschließen, dass bis jetzt erst in Ansätzen bekannte Funktionen des zellulären Prion-Proteins bzw., deren Ausfall an der Pathogenese von Skelettmuskelerkrankungen beteiligt sein könnten. So spielt das Prion-Protein eine wichtige Rolle bei der Interaktion mit Rezeptor-ähnlichen Molekülen im Prozess der zellulären Signaltransduktion. Als Rezeptoren kommen dabei verschiedene Kandidaten in Frage: so interagiert das zelluläre Prion-Protein z.B. mit Laminin und dem 37-kDa Laminin-Rezeptor (Graner et al., 2000; Rieger et al; 1997). Diese Moleküle findet man, ebenso wie die weiteren Rezeptor-Kandidaten Caveolin (Mouillet-Richard et al., 2000) und den Dystroglykan-Komplex (Keshet et al., 2000) auch in Skelettmuskelfasern.

Weitere Untersuchungen in diesem Zusammenhang haben zu der Vermutung geführt, dass das zelluläre Prion-Protein Teil eines Plasmamembran-assoziierten Proteinkomplexes ist, der aufgrund seiner Lokalisation unter physiologischen Bedingungen an der Verbindung und/oder Signaltransduktion von der Extrazellulärmatrix zum intrazellulären Milieu beteiligt ist (Wechselberger et al., 2002).

Diese multimodale Rolle des Prion-Proteins im Hinblick auf die verschiedenen Prionen-assoziierten Erkrankungen unterstützt die Möglichkeit, dass Veränderungen im normalen zellulären Prion-Protein zu

pathologischen loss-of-function Phänomenen führen können, die bis jetzt noch nicht berücksichtigt wurden.

5.3. α B-Crystallin Sequenzanalyse

α B-Crystallin ist ein Protein mit Chaperonaktivität (Muchowski et al., 1996), das mit verschiedenen neurologischen Erkrankungen assoziiert wird.

So akkumuliert es in Rosenthalfasern bei der Alexander-Erkrankung (Iwaki et al., 1989), in Lewy bodies bei der Lewy-Body-Erkrankung (Lowe et al., 1990) und in reaktiven Gliazellen bei CJD (Renkawek et al., 1992). Auch in scrapie-infiziertem Hirngewebe vom Hamster lässt sich eine α B-Crystallin-Gen-Expression nachweisen (Duguid et al., 1988).

Die Expression von α B-Crystallin als Mitglied der „small heat-shock-protein“ Familie wird, wie auch bei anderen Mitgliedern gesichert, durch thermischen, hypertonen und osmotischen Stress induziert. Außerdem ist bekannt, dass Chaperone der „small-heat-shock-protein“-Familie Protein-Faltungen in höhere Strukturen katalysieren und Proteine vor Funktionsverlusten, ausgelöst durch „Stress“, schützen. Bei s-IBM Patienten lässt sich α B-Crystallin immunhistochemisch in bis zu 30% der zahlreichen pränekrotischen Muskelfasern nachweisen und wird außerdem im s-IBM-Muskel überexprimiert (Sarkozi et al., 1994; Banwell et al., 2000). Aus diesem Grund ist α B-Crystallin in seiner Funktion als Chaperon in den Skelettmuskelzellen von s-IBM Patienten auch im Hinblick auf die Funktion des Prion-Proteins interessant.

Da PrP mehrfach posttranslational modifiziert wird und die Strukturveränderung von der α -Helix- zur β -Faltblatt-Struktur entscheidend für die Pathogenität des Prion-Proteins ist (Mastrianni et al., 1999), stellt sich die Frage nach den an dieser Strukturveränderung beteiligten Molekülen und deren Veränderungen. Tierexperimentell fand sich bei Mäusen, die eine Deletion im α B-Crystallin-Gen und im angrenzenden HspB2-Gen aufwiesen, eine progressive Myopathie.

Ebenso konnte gezeigt werden, dass eine Missense Mutation im humanen α B-Crystallin-Gen (R120G) eine Kardiomyopathie und eine autosomal-dominante Myopathie (sogenannte desmin-related-myopathy) hervorrufen kann, die durch Myofibrillenzerstörung und Akkumulation von Desmin und α B-Crystallin in degenerierenden Muskelfasern charakterisiert ist (Vicart et al., 1998). Außerdem ist der Träger dieser R120G-Mutation stark in seiner Chaperonaktivität eingeschränkt (Bova et al 1999; Perng et al 1999). Vor kurzem wurden bei Patienten mit Desmin-related-Myopathy zwei weitere Mutationen (464delCT und Q151X) in einer Region des α B-Crystallin-Gen gefunden, welche entscheidend für die Chaperonfunktion des Proteins ist (Selcen and Engel, 2003). Dies könnte auf eine mögliche Auswirkung von α B-Crystallin-Veränderungen hinsichtlich der Prion-Protein-Funktion bei s-IBM-Patienten hinweisen.

Die in dieser Arbeit auf Mutationen im dritten Exon des α B-Crystallin-Gen bzw. auf Mutationen im gesamten kodierenden Bereich des Gens untersuchten Patienten wiesen keine Abweichungen von der

Wildtyp-Sequenz auf. Lediglich bei einem s-IBM-Patienten fand sich ein Adenin zu Guanin Austausch im Kodon 55 des Exon 1, der aber keinen Aminosäureaustausch zur Folge hatte.

Die Gensequenz im untersuchten Bereich des α B-Crystallin-Gen gibt somit allein keinen ausreichenden Aufschluss über eine mögliche Beteiligung des α B-Crystallins am zugrundeliegenden Pathomechanismen der s-IBM. Allerdings ist denkbar, dass es einen „biologischen Stressor“ als Auslöser der α B-Crystallin Überexpression in s-IBM Muskelfasern gibt.

Der nukleäre Transkriptionsfaktor NF- κ B könnte dabei eine Rolle als Mediator der Stress-Signale spielen (Yang et al., 1998; Ray et al., 1999). Nach dieser Hypothese könnte das „Stressprotein“ die Muskelfaser für eine gewisse Zeit, möglicherweise für mehrere Jahre, vor Schädigung schützen, bevor klinische Symptome auftreten. Dies könnte auch den späten Erkrankungsbeginn erklären; möglicherweise sind aber auch ältere Muskelfasern vulnerabler für die zerstörerischen Effekte des ätiologisch auslösenden Agens der s-IBM.

Dieser bislang unidentifizierte Stressor könnte zu einer erhöhten Expression von stress-assoziierten Proteinen, i.e. α B-Crystallin im Skelettmuskel führen. Erhöhte α B-Crystallin Expression könnte, wie schon postuliert wurde, zu einer Triggerung des Immunsystems beitragen und einige der entzündlichen Phänomene der IBM erklären. Vermehrte α B-Crystallin Expression allein führt jedoch nicht automatisch zur Entwicklung einer s-IBM. Vielmehr müsste zusätzlich eine genetische Prädisposition, z.B. Homozygotie am Kodon 129 des Prion-Gens, bestehen, die bei andauernder Überexpression des Chaperons α B-Crystallin zu einer vermehrten Umfaltung zahlreicher, neurodegenerations-assoziiierter Proteine führt. Deren Akkumulation bewirkt in der Folge die Degeneration von Skelettmuskelfasern. Auch α B-Crystallin unterliegt ähnlich dem Prion-Protein verschiedenen Mechanismen der posttranslationalen Modifikation, wie Phosphorylierung, Acetylierung, Deamination etc. Für einige Chaperone ist bekannt, dass sie unter „Stress“ vermehrt modifiziert und in ihrer Chaperonaktivität beeinflusst werden. Dies könnte in Analogie auch für α B-Crystallin zutreffen.

Wenn die Expression von α B-Crystallin mit dem Nachweis spezifischer pathologisch gefalteter Prion-Proteine korrelieren würde, hätte das weitreichende Konsequenzen für die pathogenetische Charakterisierung der s-IBM als Prion-assoziierte Erkrankung.

Die Expression von α B-Crystallin stellt möglicherweise einen frühen und wichtigen Schritt in der Pathogenese der s-IBM dar, da sie sich nicht auf nekrotische oder vakuolisierte Fasern beschränkt, sondern auch in morphologisch unauffälligen, pränekrotischen Fasern nachweisbar ist (Brady et al., 2001). Sowohl die Interaktion von α B-Crystallin mit anderen Chaperonen, z.B. mit HSP-28 im humanen Skelettmuskel (Kato et al., 1992), als auch die verschiedenen z.T. stressabhängigen posttranslationalen Modifikationen und die daraus resultierenden Aktivitätsänderungen könnten bei der Triggerung der pathogenetischen Veränderungen des Prion-Proteins und damit möglicherweise auch in der Pathogenese der s-IBM eine Rolle spielen.

6. Zusammenfassung und Ausblick

Die sporadische Einschlusskörpermyositis (s-IBM) ist eine chronisch progressive, entzündliche Muskelerkrankung, die vor allem nach dem 50. Lebensjahr auftritt. Die Pathogenese der s-IBM ist unklar, es werden verschiedenste Mechanismen diskutiert.

Der Nachweis von Prion-Protein in den Einschlüssen der Skelettmuskelzellen bei s-IBM-Patienten führte zu der Vermutung, dass es sich um eine genetisch prädisponierte, degenerative Erkrankung des Muskels handelt und rückte die s-IBM damit in die Nähe der Prion-Erkrankungen.

Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zur Sequenz des Prion-Gens bei Patienten mit s-IBM stellen in diesem Zusammenhang einen wichtigen Beitrag zur Klärung der Pathogenese der Erkrankung dar.

Es wurden bei 35 s-IBM Patienten die Zygote am Kodon 129 des Prion-Gens und die Sequenz des Prion- und des α B-Crystallin-Gens untersucht. Dabei fand sich eine signifikante Häufung der Methionin/Methionin-Homozygotie bei s-IBM-Patienten im Gegensatz zum deutlichen Überwiegen der Methionin/Valin-Heterozygotie bei der gesunden Kontrollpopulation.

Diese Untersuchungen zeigen, dass ein bestimmter Genotyp, wie eine Methionin/Methionin-Homozygotie, zwar - im Unterschied zur hereditären IBM - nicht als alleinige Ursache der sporadischen IBM angesehen werden kann, aber dennoch einen wichtigen Risikofaktor (genetische Prädisposition) zur Entstehung einer s-IBM darstellt.

Außerdem wurde in dieser Arbeit bei einem s-IBM-Patienten eine bis dahin noch nicht beschriebene Mutation H140R im Prion-Gen gefunden. Auch die Tochter des Patienten, die möglicherweise aufgrund ihres geringeren Alters noch präsymptomatisch ist, trägt diese Mutation.

Der Bereich dieses Aminosäureaustausches liegt in einer bei Säugetieren hochkonservierten Region und ist möglicherweise nicht neutral in Bezug auf die Funktion des Prion-Proteins.

Die Funktion des α B-Crystallins als Chaperon, welches neben der korrekten Proteinfaltung möglicherweise auch die Umfaltung von Proteinen in pathologische Formen wie z.B. in PrP^{sc} katalysiert, macht dieses Protein interessant im Hinblick auf die Funktion des Prion-Proteins.

Da bekannt ist, dass Muskelfasern von s-IBM-Patienten vermehrt α B-Crystallin exprimieren, wurden in dieser Arbeit sieben Patienten auf Mutationen im gesamten α B-Crystallin-Gen und insgesamt 24 Patienten auf Sequenzabweichungen im dritten Exon untersucht.

In der Mutationsanalyse stellte sich heraus, dass es bis auf einen schon bekannten Polymorphismus (A117A) keine weiteren Abweichungen von der Wildtypsequenz gab. Lediglich bei einem Patienten fand sich der A117A-Polymorphismus ohne konsekutiven Aminosäureaustausch.

In weiterführenden Untersuchungen sollte im selben Schritt geklärt werden, ob posttranslationale Modifikationen, wie z.B. die unterschiedlichen Glykosilierungsmuster oder Veränderungen höherer Proteinfaltungsstrukturen des Prion-Proteins eine Rolle bei der Pathogenese der s-IBM spielen, und ob

Veränderungen der Chaperonfunktion des α B-Crystallins möglicherweise ebenso einen Einfluss auf die Funktion des Prion-Proteins haben.

Auch expressionsregulierende Faktoren oder Faktoren, die durch externe Einflüsse getriggert werden, könnten sowohl im Zusammenhang mit der α B-Crystallin-Transkriptionsrate, als auch bei der Prion-Protein-Expression, eine Rolle spielen.

Dies würde auch Einfluss auf zukünftige Therapien (z.B. Einsatz von Chaperon-Inhibitoren) haben, die dann auf das Ziel, die pathologische Umfaltung und Akkumulation von Proteinen zu reduzieren oder ganz zu vermeiden, ausgerichtet sein könnten.

Ein besseres Verständnis der Pathogenese der s-IBM kann dazu beitragen, zukünftig bessere therapeutische Optionen zu entwickeln.

7. Literatur

Alperovitch A, Zerr I, Pocchiari M, Mitrova E, de Pedro Cuesta J, Hegyi I, Collins S, Kretzschmar H, van Duijn C, Will RG Codon 129 prion protein genotype and sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Lancet* 1999;353:1673-1674

Argov Z, Tiram E, Eisenberg I, Sadeh M, Seidman CE, Seidman JG, Karpati G, Mitrani-Rosenbaum S Various types of hereditary inclusion body myopathies map to chromosome 9p1-q1. *Annals of Neurology* 1997;41:548-551

Askanas V, Engel WK New advances in inclusion body myositis. *Curr Opin Rheumatol* 1993;5:723-741

Askanas V, Bilak M, Engel WK et al., prion protein is strongly immunolocalized at the postsynaptic domain of human normal neuromuscular junction. *Neurosci Lett* 1993;159:111-114

Askanas V, Bilak M, Engel WK, Alvarez RB, Tome F, Leclerc A Prion protein is abnormally accumulated in inclusion-body myositis. *Neuroreport* 1993;5:25-28

Askanas V, Engel WK, Bilak M, Alvarez RB, Selkoe DJ Twisted tubulofilaments of inclusion body myositis muscle resemble paired helical filaments of Alzheimer brain and contain hyperphosphorylated tau. *Am J Pathol* 1994;144:177-187

Askanas V, Sarkozi E, Bilak M, Alvarez RB, Engel WK Human muscle makrophages express beta-amyloid precursor and prion proteins and their mRNAs. *Neuroreport* 1995;6:1045-1049

Askanas V, McFerrin J, Baque S, Alvarez RB, Sarkozi E, Engel WK Transfer of beta-amyloid precursor protein gene using adenovirus vector causes mitochondrial abnormalities in cultured normal human muscle. *Proc Natl Acad Sci* 1996;93:1314-1319

Askanas V, Engel WK Sporadic inclusion-body myositis and hereditary inclusion-body myopathies: current concepts of diagnosis and pathogenesis. *Curr Opin Rheumatol.* 1998;10:530-542

Askanas V, Engel WK, Yang CC, Alvarez RB, Lee VM, Wisniewski T 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* 1998;152:889-895

Askanas V, Engel WK. Inclusion-body myositis: newest concepts of pathogenesis and relation to aging and Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 2001;60:1-14

Avdulov NA, Chochina SV, Igbavboa U, Warden CS, Vassiliev AV, Wood WG. Lipid binding to amyloid beta-peptide aggregates: preferential binding of cholesterol as compared with phosphatidylcholine and fatty acids. *J Neurochem* 1997;69:1746-1752

Banwell BL, Engel AG α B-Crystallin immunolocalization yields new insights into inclusion body myositis. *Neurology* 2000;54:1033-1041

Barohn RJ, Amato AA, Sahenk Z, Kissel JR, Mendell JR Inclusion body myositis: explanation for poor response to immunosuppressive therapy. *Neurology* 1995;45:1302-1304

Beck EP, Daniel M, Parry HP Degeneration of the cerebellar and hypothalamo-neurohypophysial system in sheep with scrapie and its relationship to human systems degenerations. *Brain* 1964;87:153-176

Behrens L, Bender A, Johnson MA, Hohlfeld R Cytotoxic mechanism in inflammatory myopathies: co-expression of Fas and protective Bcl-2 in muscle fibers and inflammatory cells. *Brain* 1997;120:929-938

- Bendheim PE**, Brown HR, Rudelli RD, Scala LJ, Goller NL, Wen GY, Kascsak RJ, Cashman NR, Bolton DC Nearly ubiquitous tissue distribution of the scrapie agent precursor protein. *Neurology* 1992;42:149-156.
- Bennardini F**, Wrzosek A, Chiesi M α B-Crystallin in cardiac tissue: association with actin and desmin filaments. *Circ Res* 1992;71:288-294
- Billeter M**, Riek R, Wider G, Hornemann S, Glockshuber R, Wuthrich K Prion protein NMR structure and species barrier for prion diseases. *Proc Natl Acad Sci* 1997;94:7281-7285
- Bodovitz S**, Klein WL Cholesterol modulates alpha-secretase cleavage of amyloid precursor protein. *J Biol Chem* 1996;271:4436-4440
- Bosanquet FD**, Daniel M, Parry HP, Myopathy in sheep, its relationship to scrapie and to dermatomyositis and muscular dystrophy. *Lancet* 1956;271:737-746
- Bova MP**, Yaron O, Huang Q, Ding L, Haley DA, Stewart PL, Horwitz Mutation R120G in alphaB-crystallin, which is linked to a desmin-related myopathy, results in an irregular structure and defective chaperone-like function. *J Proc. Natl. Acad. Sci.* 1999;96:6137-6142
- Brady JP**, Garland DL, Green DE, Tamm ER, Giblin FJ, Wawrousek EF Invest. *Ophthalmol. Vis. Sci* 2001;42:2924-2934
- Brown DR**, Qin K, Herms JW, Madlung A, Manson J, Strome R, Fraser PE, Kruck T, von Bohlen A, Schulz-Schaeffer W, Giese A, Westaway H, Kretzschmar H The cellular prion protein binds copper in vivo, *Nature* 1997;390:684-687
- Brown DR**, Besinger A. Prion protein expression and superoxide dismutase activity. *Biochem J* 1998;334:423-429.
- Brown DR**, Schmidt B, Kretzschmar HA Effects of copper on survival of prion protein knockout neurons and glia. *J. Neurochem* 1998;70:1686-1693.
- Carpenter S, Karpati G**, Heller I, Eisen A Inclusion body Myositis: a distinct variety of idiopathic inflammatory myopathy. *Neurology* 1978;28:8-17
- Chou SM** Myxovirus-like structures in a case of human chronic polymyositis. *Science* 1967;158:1453-1455
- Chou SM** Inclusion body myositis: a chronic persistent mumps myositis? *Hum Pathol* 1986;17:765-777
- Dalakas MC** Polymyositis, dermatomyositis and inclusion body myositis. *N Engl J Med* 1991;325:1487-1498
- Dalakas MC** Update on the use of intravenous immune globulin in the treatment of patients with inflammatory muscle disease. *J Clin Immunol Suppl* 1995;6:70-75
- Dalakas MC**, Sonies BC, Lopez-Devine J, Sapper DJ Dysphagia as a frequent manifestation in patients with inclusion body myositis. *Neurology* 1996;46:116
- Dalakas MC**, Sonies B, Dambrosia J, Sekul E, Cupler E, Sivakumar K Treatment of inclusion body myositis with IVIg: a double-blind, placebo-controlled study. *Neurology* 1997;48:712-716
- DeArmond SJ** Prusiner SB Prion diseases. In Greenfield's *Neuropathology*, Graham and Lantos, eds. Arnold and Oxford University Press Inc 1997:235-280

- Deslys JP**, Marce D, Dormont D. Similar genetic susceptibility in iatrogenic and sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *J Gen Virol* 1994;75:23–27.
- Dlouhy SR**; Hsiao K; Farlow MF; Foroud T; Conneally PM; Johnson P; Prusiner SB; Hodes ME; Ghetti B Linkage of the Indiana kindred of Gerstmann-Straussler-Scheinker disease to the prion protein gene. *Nature Genet* 1992;1:64-67,
- Duguid JR**, Rohwer RG, Seed B Isolation of cDNAs of scrapie-modulated RNAs by subtractive hybridization of a cDNA library *Proc. Natl. Acad.Sci.* 1988;85:5738-5742
- Eisenberg I**, Avidan N, Potikha T, Hochner H, Chen M, Olender T, Barash M, Shemesh M, Sadeh M, Grabov-Nardini G, Shmilevich I, Friedmann, A, Karpati G, Bradley WG, Baumbach L, Lancet D, Ben Asher E, Beckmann JS, Argov Z, Mitrani-Rosenbaum S, The UDP-N-acetylglucosamin-2-epimerase/N-acetylmannosamine kinase gene is mutated in recessive hereditary inclusion body myopathy. *Nature Genet* 2001;29:83-87
- Engel WK**, Askanas V, Treatment of inclusion body myositis and hereditary inclusion body myopathy with reference to pathogenetic mechanism: personal experience. In: Askanas V, Serratrice C, Engel WK, editors. *Inclusion body myositis and myopathy*. Cambridge University Press 1998:351-382
- Figarella-Branger D**, Pellissier JF, Pouget J, Calore EE, Azulay JP, Desnuelle C, Serratrice G Inclusion body myositis and neuromuscular diseases with rimmed vacuoles. *Rev Neurol* 1992;148:281-290.
- Frears ER**, Stephens DJ, Walters CE, Davies H, Austen BM. The role of cholesterol in the biosynthesis of beta-amyloid. *Neuroreport* 1999;10:1699–1705
- Fukuchi K**, Pham D, Hart M, Li L, Lindsey JR. Amyloid-beta deposition in skeletal muscle of transgenic mice: possible model of inclusion body myopathy. *Am J Pathol* 1998;153:1687-1693.
- Fyhr IM**, Moslemi AR, Tarkowski A, Lindberg C, Oldfors A Limited T-cell receptor V gene usage in inclusion body myositis. *Scand J Immunol* 1996;43:109-114
- Gabriel JM**, Oesch B, Kretschmar H, Scott M, Prusiner SB Molecular cloning of a candidate chicken prion protein. *Proc Natl Acad Sci* 1992;89:9097–9101.
- Garlepp MJ**, Laing B, Zilko PJ, Ollier W, Mastaglia FL HLA associations with inclusion body myositis. *Clin Exp Immunol* 1994;98:40-45
- Garlepp MJ**, Tabarias H, van Bockxmeer F, Zilko PJ, Laing B, Mastaglia FL Apolipoprotein E epsilon-4 in inclusion body myositis. *Ann. Neurol.* 1995;38:957-959
- Garlepp MJ**, Blechynden L, Tabarias H, Mastaglia FL Genetic factors in sporadic inclusion body myositis. In: Askanas V, Serratrice C, Engel WK, editors. *Inclusion body myositis and myopathies*. Cambridge University Press 1998:177-185
- Gauczynski S**, Hundt C, Leucht C, Weiss S, Interaction of prion proteins with cell surface receptors, molecular chaperones, and other molecules, *Adv. Protein Chem* 2001;57:229–272
- Glatzel M**, Abela E, Maissen M, Aguzzi A Extraneural pathologic prion protein in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *N Engl J Med.* 2003;349:1812-1820
- Gohel C**, Grigoriev V, Escaig-Haye F, Lasmezas CI, Deslys JP, Langeveld J, Akaaboune V, Hantai D, Fournier JG Ultrastructural localization of cellular prion protein (PrPc) at the neuromuscular junction. *J Neurosci Res* 1999;55:261-267

Goldfarb LG; Brown P; Haltia M; Cathala F; McCombie WR; Kovanen J; Cervenakova L; Goldin L; Nieto A; Godec MS; Asher DM; Gajdusek DC :Creutzfeldt-Jakob disease cosegregates with the codon 178-asn PRNP mutation in families of European origin. *Ann. Neurol* 1992;31:274-281

Goldfarb LG; Petersen RB; Tabaton M; Brown P; LeBlanc AC; Montagna P; Cortelli P; Julien J; Vital C; Pendelbury WW; Haltia M; Wills PR; Hauw JJ; McKeever PE; Monari L; Schrank B; Swergold GD; Autilio-Gambetti L; Gajdusek DC; Lugaresi E; Gambetti P :Fatal familial insomnia and familial Creutzfeldt-Jakob disease: disease phenotype determined by a DNA polymorphism. *Science* 1992;258:806-808

Graner E, Mercadante AF, Zanata SM, Forlenza OV, Cabral AL, Veiga SS, Juliano MA, Roesler R, Walz R, Minetti A, Izquierdo I, Martins VR, Brentani RR Cellular prion protein binds laminin and mediates neuritogenesis. *Brain Res Mol Brain Res*. 2000;76:85-92

Group TMS, Randomized pilot trial of beta INF1a (Avonex) in patients with inclusion body myositis. *Neurology* 2001;57:1566-1570

Hauw JJ, Sazdovitch V, Laplanche JL, Peoc'h K, Kopp N, Kemeny J, Privat N, Delasnerie-Laupretre N, Brandel JP, Deslys JP, Dormont D, Alperovitch A Neuropathologic variants of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease and codon 129 of PrP gene. *Neurology* 2000;54:1641-1646

Hegde RS, Mastrianni JA, Scott MR, DeFea KA, Tremblay P, Torchia M, DeArmond SJ, Prusiner SB, Lingappa VR A transmembrane form of the prion protein in neurodegenerative diseases. *Science* 1998;279:827-834

Hill AF, Desbruslais M, Joiner S, Sidle KC, Gowland I, Collinge J, Lantos P The same prion strain causes vCJD and BSE. *Nature* 1997;389:448-450

Hsiao K, Baker HF, Crow TJ, Poulter M, Owen F, Terwilliger JD, Westaway D, Ott J, Prusiner SB Linkage of a prion protein missense variant to Gerstmann-Straussler syndrome. *Nature* 1989;338:342-345

Hohlfeld R, Engel AG, Goebels N, Behrens L Cellular immune mechanism in inflammatory myopathies. *Curr Opin Rheumatol* 1997;9:520-526

Hornshaw MP, McDermott JR, Candy JM Copper binding to the N-terminal tandem repeat regions of mammalian and avian prion protein *Biochem. Biophys Res Commun* 1995;207:621-629

Hulland WH, The skeletal muscle of sheep affected with scrapie. *J Comp Pathol Ther* 1958;68:264-274

Iwaki T, Kume-Iwaki A, Liem RK, Goldman JE Alpha B-crystallin is expressed in non-lenticular tissues and accumulates in Alexander's disease brain. *Cell* 1989;57:71-78

Iwaki T, Wisniewski T, Iwaki A, Corbin E, Tomokane N, Tateishi J, Goldman JE Accumulation of α B-crystallin in central nervous system glia and neurons in pathologic condition. *Am J Pathol* 1992;140:345-356

Jaworska-Wilczynska M, Wilczynski GM, EngelWK, Strickland DK, Weisgraber KH, Askanas V Three lipoprotein receptors and cholesterol in inclusion-body myositis muscle. *Neurology* 2002;58:438-445

Kayashima T, Matsuo H, Satoh A, Ohta T, Yoshiura K, Matsumoto N, Nakane Y, Niikawa N, Kishino T Nonaka myopathy is caused by mutations in the UDP-N-acetylglucosamine-2-epimerase/N-acetylmannosamine kinase gene (GNE). *J Hum Genet*. 2002;47:77-79

Kato K, Shinohara H, Goto S, Inaguma Y, Morishita R, Asano T Copurification of small heat shock protein with alpha B crystallin from human skeletal muscle. *J. Biol. Chem* 1992;267:7718-7725

- Keshet GI**, Bar-Peled O, Yaffe D, Nudel U, Gabizon R The cellular prion protein colocalizes with the dystroglycan complex in the brain. *J Neurochem.* 2000;75:1889-1897.
- Kimberlin RH**, Millson GC, Bountiff L, Collis SC A comparison of the biochemical changes induced in mouse brain cuprizone toxicity and by scrapie infection. *J Comp Path* 1974;84:263-270
- Koffman BM**, Rugiero M, Dalakas MC Immune-mediated conditions and antibodies associated with sporadic inclusion body myositis. *Muscle and Nerve* 1998;21:115-117
- Kok CC**, Croager EJ, Witt CS, Kiers L, Mastaglia FL, Abraham LJ, Garlepp MJ Mapping of a candidate region for susceptibility to inclusion body myositis in the human major histocompatibility complex. *Immunogenetics* 1999;49:508-516
- Kok CC**, Boyt A, Gaudieri S, Martins R, Askanas V, Dalakas M, Kiers L, Mastaglia FL, Garlepp M Mitochondrial DNA variants in inclusion body myositis and Alzheimer's disease. *Neuromuscular Disorders* 2000;10:604-611
- Kovacs GG**, Gasque P, Ströbel T, Lindeck-Pozza E, Strohschneider M, Ironside JW, Budka H, Guentchev M Complement activation in human prion disease. *Neurobio of Disease* 2004;15:21-25
- Kovacs GG**, Lindeck-Pozza E, Chimelli L, Araujo AQ, Gabbai AA, Strobel T, Glatzel M, Aguzzi A, Budka H Creutzfeldt-Jakob disease and inclusion body myositis: abundant disease-associated prion protein in muscle. *Ann Neurol.* 2004;55:121-125
- Kretschmar HA**, Molecular pathogenesis of prion diseases. *Eur.Arch. Psychiatry Clin. Neurosci* 1999;249:56-63.
- Lampe J**, Kitzler H, Walter MC, Lochmüller H, Reichmann H Methionine homozygosity at prion gene codon 129 may predispose to sporadic inclusion body myositis. *Lancet* 1999;353:465-466
- Laplanche JL**, Delasnerie-Laupretre N, Brandel JP, Chatelain J, Beaudry P, Alperovitch A, Launay JM Molecular genetics of prion diseases in France. French Research Group on Epidemiology of Human Spongiform Encephalopathies. *Neurology* 1994;44:2347-2351
- Lindberg C**, Oldfors A, Hedstrom A Inclusion body myositis: peripheral nerve involvement. Combined morphological and electrophysiological studies on peripheral nerves. *J Neurol Sci* 1990;99:327-338
- Lindberg C**, Persson LI, Björkander J, Olfors A Inclusion body myositis: clinical, morphological, physiological and laboratory findings in 18 cases. *Acta Neurol Scand* 1994;89:123-131
- Lotz BP**, Engel AG, Nishino H, Stevens JC, Litchy W Inclusion body myositis. Observations in 40 patients. *Brain* 1989;112:727-747
- Lowe J**, Landon M, Pike I, Spendlove I, McDermott H, Mayer RJ Dementia with beta-amyloid deposition: involvement of alpha B-crystallin supports two main diseases. *Lancet* 1990;336:515-516
- Lowe J**, McDermott H, Pike I, Spendlove I, Landon M, Mayer RJ α B-crystallin expression in non-lenticular tissues and selective presence in ubiquitinated inclusion bodies in human disease. *J Pathol* 1992;166:61-68
- Lundberg IE** The role of cytokines, chemokines, and adhesion molecules in the pathogenesis of idiopathic inflammatory myopathies. *Curr Rheumatol Rep* 2000;2:216-224
- Martinsson T**, Darin N, Kyllerman M, Oldfors A, Hallberg B, Wahlström J Dominant hereditary inclusion body myopathy gene (IBM3) maps to chromosome region 17p13.1. *Am J Hum Genet* 1999;64:1420-1426

- Mastrianni JA**, Nixon R, Layzer R, Telling GC, Han D, DeArmond SJ, Prusiner SB Prion Protein Conformation in a patient with sporadic fatal insomnia. *NEJM* 1999;340:1630-1638
- Megens-de Letter MA**, Visser LH, van Doorn PA, Savelkoul HF Cytokines in the muscle tissue of idiopathic inflammatory myopathies: implications for immunopathogenesis and therapy. *Eur Cytokine Netw* 1999;10:471-478.
- Merideth C**, Kamradt, Feng Chen, Susan Sam, and Vincent L. Cryns, The Small Heat Shock Protein α B-crystallin Negatively Regulates Apoptosis during Myogenic Differentiation by Inhibiting Caspase-3 Activation. *J BioChem* 2002;277:38731-38736
- Milhavet O**, McMahon HE, Rachidi W, Nishida N, Katamine S, Mange A, Arlotto M, Casanova D, Riondel J, Favier A, Lehmann S Prion infection impairs the cellular response to oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci* 2000;97:13937–13942.
- Mirabella M**, Alvarez RB, Engel WK, Weisgraber KH, Askanas V Apolipoprotein E and apolipoprotein E messenger RNA in muscle of inclusion body myositis and myopathies. *Ann Neurol.* 1996;40:864-872
- Mizuno T**, Nakata M, Naiki H, et al. Cholesterol-dependent generation of a seeding amyloid beta-protein in cell culture. *J Biol Chem* 1999;274:15110–15114
- Mouillet-Richard S**, Ermonval M, Chebassier C, Laplanche JL, Lehmann S, Launay JM, Kellermann O Signal transduction through prion protein, *Science* 2000;289:1925–1928
- Muchowski PJ**, Bassuk JA, Lubsen NH, Clark JI Human α B-Crystallin. Small heat shock protein and molecular chaperone. *J Biol Chem* 1996;272:2578-2582
- Mullis KB**, The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Sci Am.* 1990;262:56-61
- Nalbantoglu J**, Karpati G, Carpenter S Conspicuous accumulation of a single-stranded DNA binding protein in skeletal muscle fibers in inclusion body myositis. *Am J Pathol* 1994;144:874-882
- Orth M**, Tabrizi SJ, Schapira AH Sporadic inclusion body myositis not linked to prion protein codon 129 methionine homozygosity. *Neurology* 2000;55:1235
- Palmer MS**, Dryden AJ, Hughes JT, Collinge J Homozygous prion protein genotype predisposes to sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Nature* 1991;353:340-342
- Parchi P**, Capellari S, Chen SG, Petersen RB, Gambetti P, Kopp N, Brown P, Kitamoto T, Tateishi J, Giese A, Kretzschmar H Typing prion isoforms. *Nature* 1997;386:232-234
- Parchi P**, Giese A, Capellari S, Brown P, Schulz-Schaeffer W, Windl O, Zerr I, Budka H, Kopp N, Piccardo P, Poser S, Rojiani A, Streichemberger N, Julien J, Vital C, Ghetti B, Gambetti P, Kretzschmar H Classification of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease based on molecular and phenotypic analysis of 300 subjects. *Ann Neurol* 1999;46:224-233
- Parchi P**, Capellari S, Gambetti P. Intracerebral distribution of the abnormal isoform of the prion protein in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease and fatal insomnia. *Microsc Res Tech.* 2000;50:16-25
- Pattison IH**, Jebbett JN Clinical and histological observations on cuprizone toxicity and scrapie in mice. *Res Vet Sci* 1971;12:378-380
- Perng, M. D.**, Muchowski, P. J., van Den, I. P., Wu, G. J., Hutcheson, A. M., Clark, J. I., Quinlan, R. A. The cardiomyopathy and lens cataract mutation in alphaB-crystallin alters its protein structure, chaperone activity, and interaction with intermediate filaments in vitro. *J.Biol. Chem* 1999;274:33235–33243

- Petchanikowa C**, Saborioa GP, Anderesa L, Frossarda MJ, Olmedob MI, Soto C Biochemical and structural studies of the prion protein polymorphism. *FEBS Letters* 2001;509:451-456
- Petersen RB**, Parchi P, Richardson SL, Urig CB, Gambetti P Effect of the D178N mutation and the codon 129 polymorphism on the metabolism of the prion protein. *J Biol Chem* 1996;271:12661–12668
- Pouget J**, Pellissier JF, Serratrice G Electromyographic aspects of inclusion body myositis. Macro-electromyographic study. *Rev Electroencephalogr Neurophysiol Clin* 1987;3:319-328
- Prusiner SB** Molecular biology and pathogenesis of prion diseases *Trends. Biochem Sci.* 1996;21:482-487
- Ray A**, Ray BK Persistent expression of serum amyloid A during experimentally induced chronic inflammatory condition in rabbit involves differential activation of SAF, NF- κ B, and C/EBP Transcription Factors. *J Immunol* 1999;163:2143-2150.
- Renkawek K**, De Jong WW, Merck KB, Frenken CWGM, van Workum FPA, Bosman GJCGM α B-crystallin is present in reactive glia in Creutzfeldt-Jakob disease. *Acta Neuropathol* 1992;83:324–327
- Rieger R**, Edenhofer F, Lasmezas CI, Weiss S The human 37-kDa laminin receptor precursor interacts with the prion protein in eukaryotic cells. *Nat Med.* 1997;3:1383-1388
- Rosenthal NP**, Keeseey J, Crandall B, Brown WJ Familial neurological disease associated with spongiform encephalopathy. *Arch Neurol* 1976;33, 252-259
- Salvatore M**, Genuardi M, Petraroli R, Masullo C, Pocchiari M Polymorphisms of the prion protein gene in Italian patients with Creutzfeld-Jakob disease. *Hum Gent* 1994:375-379
- Sarkozi E**, Askanas V, Engel WK Abnormal accumulation of prion protein mRNA in muscle fibers of patients with sporadic inclusion-body myositis and hereditary inclusion- body myopathy. *Am J Pathol* 1994;145,1280-1284
- Schätzl HM**, Laszlo L, Holtzman DM, Tatzelt J, DeArmond SJ, Weiner RI, Mobley WC, Prusiner SB A hypothalamic neuronal cell line persistently infected with scrapie prions exhibits apoptosis. *J Virol* 1997;71:8821-8831
- Schirmer EC**, Lindquist S Interactions of the chaperone Hsp104 with yeast Sup35 and mammalian PrP. *Proc Natl Acad Sci* 1997;94:13932-13937
- Schulz-Schaeffer WJ**, Giese A, Windl O, Kretschmar HA Polymorphism at codon 129 of the prion protein gene determines cerebellar pathology in Creutzfeld-Jakob disease. *Clin Neuropathol* 1996;15:353-357
- Scott MR**, Kohler R, Foster D, Prusiner SB Chimeric prion protein expression in cultured cells and transgenic mice. *Protein Sci* 1992;1:986-997
- Sekul EA**, Dalakas MC Inclusion body myositis: new concepts. *Semin Neurol* 1993;13:256-263
- Selcen D**, Engel AG Myofibrillar myopathy caused by novel dominant negative B-crystallin mutations. *Ann Neurol* 2003;54:804-810
- Shinohara H**, Inaguma Y, Goto S, Inagaki T, Kato K α Bcrystallin and HSP28 are enhanced in the cerebral cortex of patients with Alzheimer's disease. *J Neurol Sci* 1993;119:203–208
- Sparkes RS**, Simon M, Cohn VH, Fournier RE, Lem J, Klisak I, Heinzmann C, Blatt C, Lucero M, Mohandas T, Assignment of the human and mouse prion protein genes to homologous chromosomes. *Proc Natl Acad Sci* 1986;83:7358–7362.

- Tawil R**, Griggs RC Inclusion body myositis. *Curr Opin Rheumatol* 2002;16:653-657
- Waggoner DJ**, Bartnikas TB, Gitlin JD The role of copper in neurodegenerative disease. *Neurobiol Dis* 1999;6:221-230
- Walter MC**, Lochmüller H, Toepfer M, Schlotter B, Reilich P, Schröder M, Müller-Felber W, Pongratz D High-dose immunoglobulin therapy (IVIG) in inclusion body myositis (IBM): A double-blind, placebo-controlled study. *J Neurol* 2000;247:22-28
- Wechselberger C**, Wurm S, Pfarr W, Höglinger O The Physiological Function of Prion Protein. *Experimental Cell Res* 2002;281:1-8
- Westaway D**, DeArmond SJ, Cayetano-Canlas J, Groth D, Foster D, Yang SL, Torchia M, Carlson GA, Prusiner SB Degeneration of skeletal muscle, peripheral nerves, and the central nervous system in transgenic mice overexpressing wild-type prion proteins. *Cell* 1994;76:117-29.
- Windl O**, Dempster M, Estibeiro JP, et al. Genetic basis of Creutzfeldt-Jakob disease in the United Kingdom: a systematic analysis of predisposing mutations and allelic variations in the PRNP gene. *Hum Genet* 1996;98:259-264
- Wu Y**, Brown WT, Robakis NK, Dobkin C, Devine-Gage E, Merz P, Wisniewski HM A PvuII RFLP detected in the human prion protein (PrP) gene. *Nucleic Acids Res.* 1987;15:3191
- Yang CC**, Askanas V, Engel WK, Alvarez RB Immunolocalization of transcription factor NF- κ B in inclusion body myositis muscle and at normal human neuromuscular junctions. *Neuroscience Letters* 1998;254:77-80.
- Vicart P**, Caron A, Guicheney P, Li Z, Prevost MC, Faure A, Château D, Chapon F, Tome F, Dupret JM, Paulin D, Fardeau M. A missense mutation in the alphaB-crystallin chaperone gene causes a desmin-related myopathy. *Nat.Genet.* 1998;20:92-95
- Yoy JL**, Oh SJ, Baysal AI Electrophysiological spectrum of inclusion body myositis. *Muscle Nerve* 1990;10:949-951
- Zanusso G**, Vattemi G, Ferrari S, Tabaton M, Pecini E, Cavallaro T, Tomelleri G, Filosto M, Tonin P, Nardelli E, Rizzuto N, Monaco S. Increased expression of the normal cellular isoform of prion protein in inclusion-body myositis, inflammatory myopathies and denervation atrophy. *Brain Pathol.* 2001;11:182-189
- Zimmermann K**, Turecek PL, Schwarz HP Genotyping of the prion protein gene at codon 129. *Acta Neuropathol* 1999;97:355-358

8. Anhang

Verzeichniss der verwendeten Abkürzungen

s-IBM	sporadische Einschlusskörpermyositis
h-IBM	hereditäre Einschlusskörpermyositis
PrP	Prion-Protein
PRNP	Prion-Gen
GNE	UDP-N-acetylglucosamin-2-epimerase/N-acetylmannosaminekinase
Aβ	β -Amyloid
βAPP	β -Amyloid-Vorläuferprotein
αB-C	α B-Crystallin
CJD	Creutzfeld-Jakob-Erkrankung
GSS	Gerstmann-Sträussler-Scheinker-Erkrankung
FFI	Fatale Familiäre Insomnie
LDL	low density lipoprotein
bp	Basenpaare
M/V	Methionin/Valin
M/M	Methionin/Methionin

Lebenslauf

Bettina Mendel

Persönliche Angaben

Geburtstag und –ort: 04.09.1972, Sangerhausen, Sachsen-Anhalt
Staatsangehörigkeit: Deutsch
Familienstand: Ledig

Schulbildung

1979 – 1989 Realschule in Sangerhausen
1994 – 1997 Berufsbegleitend Abiturvorbereitung im Selbststudium
bei der Studiengemeinschaft Darmstadt
07/1997 Allgemeine Hochschulreife

Berufsausbildung und Berufserfahrung

1989 – 1992 Ausbildung zur medizinisch-technischen Laborassistentin (MTA) an der
Berufsfachschule der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
1992 – 1997 MTA im neurologisch-myologischen Labor des Friedrich-Baur-Instituts

Studium

11/97 – 04/04 Studium der Humanmedizin an der LMU München

Promotion

seit 1999 Experimentelle Dissertationsarbeit im Friedrich-Baur-Institut

Danksagung

Mein besonders herzlicher Dank gilt Herrn Prof. Dr. Lochmüller, zum einen für die Überlassung dieses interessanten Themas und zum anderen für seine gewissenhafte und kontinuierliche Betreuung, sowie für die anregenden Gespräche und seine stets konstruktive Kritik, mit der er meine Arbeit in jeder Phase begleitet hat.

Besonderer Dank gilt auch Herrn Dr. Rolf Stucka und Frau Dr. Angela Abicht sowie allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Prof. Lochmüller für die wertvollen methodischen und fachlichen Hinweise und für das stets offene Ohr bei allen Fragen.

Danken möchte ich auch allen Mitarbeitern des Friedrich-Baur-Instituts für das freundliche und gute Arbeitsklima, sowie die zahlreichen Tipps und Hilfestellungen, besonders Frau Sybille Galuschka, Frau Eva Schmidtmeier und Frau Eva Wiens. Nicht zuletzt ihrer Unterstützung und Motivation ist es zu verdanken, dass diese Arbeit in der jetzigen Form vorliegt.

Abschliessend bedanken möchte ich mich bei all denjenigen, die mich über so manche Durststrecke auf dem Weg zu dieser Arbeit begleitet haben.