

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

Molekulare Diagnostik der Dysferlinopathie

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

Vorgelegt von
Christian Braun
aus
Memmingen

2005

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Hanns Lochmüller

Mitberichterstatter : Prof. Dr. med. O. K. Steinlein
Prof. Dr. med. J.-U. Walther

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Priv.-Doz. Dr. med. Maggie C. Walter

Dekan: Prof. Dr. med. Dietrich Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 24.11.2005

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht in:

Walter MC*, **Braun C***, Vorgerd M, Poppe M, Thirion C, Schmidt C, Schreiber H, Knirsch UI, Müller-Felber W, Pongratz D, Müller-Hoecker J, Huebner A, Lochmüller H (2003).

Variable reduction of caveolin-3 in patients with LGMD2B/MM.

J Neurol; 250: 1431-1438

Walter MC*, Brummer B*, Palmbach M, Knirsch U, Karitzky J, Tomczak R, **Braun C**, Grundhoff N, Bornemann A, Müller CR, Lochmüller H, Schreiber H (2005).

Long-term MRI and clinical follow-up of symptomatic and presymptomatic carriers of dysferlin gene mutations.

Acta Myol; 24: 6-16

*equal contribution

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen.....	7
A	Einleitung 9
1	Muskeldystrophie: Allgemeine Definition..... 9
2	Gliedergürtel-Muskeldystrophie: Definition und Historie..... 9
3	Das Krankheitsbild der Dysferlinopathie und seine Phänotypen..... 11
3.1	Die Gliedergürtel-Muskeldystrophie Typ 2B (LGMD2B) 12
3.2	Die Miyoshi Myopathie (MM)..... 12
3.3	Die distale anteriotibiale Muskeldystrophie (DMAT)..... 13
3.4	Die Epidemiologie der Dysferlinopathie 13
3.5	Die historische Entwicklung des Krankheitsbildes der Dysferlinopathie..... 13
4	Proteininteraktionen..... 14
4.1	Dysferlin und Caveolin-3..... 15
4.2	Dysferlin und Calpain-3..... 15
4.3	Dysferlin und Annexin-1 und -2..... 15
5	Der Pathomechanismus bei Dysferlindefizienz 16
6	Die Diagnose der Dysferlinopathie 16
7	Die Therapie von Muskeldystrophien..... 20
B	Zielsetzung der Arbeit 22
1	Etablierung eines Diagnosesystems..... 22
2	Klinische und therapeutische Bedeutung der molekularen Diagnostik 22
3	Beitrag zum Verständnis der Pathophysiologie 23
C	Material und Methoden..... 24
1	Geräte und Materialien 24
1.1	Geräte..... 24
1.1.1	Geräte für das molekularbiologische Arbeiten..... 24
1.1.2	Sonstige Geräte..... 24
1.2	Material 24
1.3	Computerprogramme 25

1.4	Patienten und Probenmaterial.....	25
1.4.1	Muskelgewebe und –zellen.....	25
1.4.2	Blutproben.....	25
2	Methoden	26
2.1	Extraktion der RNA.....	26
2.1.1	RNA-Extraktion aus Muskelbiopsat.....	26
2.1.2	RNA-Extraktion aus Myotuben.....	27
2.2	DNA-Extraktion aus EDTA-Vollblut.....	27
2.2.1	Material	27
2.2.2	Vorgehen.....	28
2.3	Photometrische Quantifizierung.....	28
2.4	Reverse Transkription von RNA in cDNA	28
2.4.1	Material	28
2.4.2	Vorgehen.....	28
2.5	Polymerase-Kettenreaktion	29
2.5.1	Material	29
2.5.2	Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion	29
2.5.3	PCR-Reaktionsbedingungen	30
2.5.4	PCR-Primer	31
2.6	Aufreinigung der PCR-Produkte in der Agarose-Gelelektrophorese.....	33
2.6.1	Material	33
2.6.2	Auftrennung und Darstellung der PCR-Produkte im Agarosegel.....	33
2.7	Gelextraktion	34
2.7.1	Material	34
2.7.2	Vorgehen.....	34
2.8	Restriktionsverdau	34
2.9	Fluoreszenzgestützte Sequenzanalyse	34
2.10	Andere Untersuchungen.....	35
D	Ergebnisse	36
1	Patienten mit Abweichungen von der Normalsequenz in der Mutationsanalyse des Dysferlin-Gens (Patienten 1-7).....	36
1.1	Klinische Daten der Patienten 1-7	36
1.2	Proteindiagnostik und Haplotypenanalyse.....	40

1.3	Molekulargenetische Befunde der Dysferlin-Gen-Diagnostik.....	41
1.4	Zusammenfassung der Diagnostik.....	44
2	Patienten ohne Abweichungen von der Normalsequenz in der Mutationsanalyse des Dysferlin-Gens (Patienten 7-18).....	45
E	Diskussion.....	49
1	Das Dysferlin-Protein in der Übersicht	49
1.1	Aufbau und Struktur	49
1.2	Lokalisierung im Gewebe und den Muskelzellen	49
1.3	Die Familie der Ferline und die Bedeutung der C2-Domänen.....	51
2	Vorbeschriebene Mutationen im Dysferlin-Gen	52
2.1	Mutationen der Patienten 1 bis 6 in dieser Studie	53
2.1.1	Mutation in Exon 30: 6bp-Insertion mit fraglicher Signifikanz.....	54
2.1.2	Mutation in Exon 7: Punktmutation mit fraglicher Signifikanz.....	54
2.1.3	Mutationen mit möglicher Bedeutung für eine entzündliche Symptomatik	54
2.1.4	Mutationen im Bereich von C2-Domänen	55
2.2	Interaktion mit Caveolin-3 und Calpain-3	55
2.2.1	Caveolin-3	55
2.2.2	Calpain-3	57
2.2.3	Zusammenfassend zu den Interaktionen.....	58
3	Limitation der Methode	59
4	Kritische Bewertung der Diagnostik bei den untersuchten Patienten dieser Studie	60
5	Weiterführende Überlegungen und Ausblick auf die Therapie	61
F	Zusammenfassung	64
G	Literaturverzeichnis	66
H	Anhang	75

Abkürzungen

µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
Abb.	Abbildung
abs.	absolut
AD	autosomal-dominant
AMPD	Myoadenylat-Desaminase
AR	autosomal-rezessiv
AS	antisense
bp	Basenpaar/e
BSA	Rinderserum-Albumin
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
CK	Creatinkinase
cm	Zentimeter
CMD1C	Kongenitale Muskeldystrophie Typ 1C
CT	Computertomographie
DMAT	Distale anteriotibiale Muskeldystrophie
DMD	Duchenne Muskeldystrophie
DM1	Myotone Dystrophie Typ 1
DNA	Desoxyribonukleinsäure
cDNA	komplementäre DNA
gDNA	genomische DNA
EDTA	Ethylendiaminotetraessigsäure
EKG	Elektrokardiographie
EMD	Emery-Dreifuss Muskeldystrophie
EMG	Elektromyographie
EtOH	Ethanol
EtBr	Ethidiumbromid
FKRP	Fukutin-related protein
FSHD	Facioscapulohumerale Muskeldystrophie
g	Gramm
GSCN	Guanidiniumthiocyanat-Lösung
GNE	UDP-N-Acetylglucosamin-2-Epimerase/N-Acetylmannosamin Kinase
h	Stunde
HCl	Salzsäure
H ₂ O _{deion}	deionisiertes Wasser
IHC	Immunhistochemie

kb	Kilobasen
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
k. M.	kein Material verfügbar
l	Liter
LGMD	Gliedergürtel-Muskeldystrophie
LMU	Ludwig-Maximilians-Universität
M	Mol
M.	Musculus
MD	Muskeldystrophie
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minute
ml	Milliliter
MM	Miyoshi Myopathie
mm	Millimeter
mM	Millimol
MRI	Magnet-Resonanz-Tomographie
Myosono	Myosonographie
Na	Natrium
nm	Nanometer
OPMD	Oculopharyngeal muscular dystrophy
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PD	Privatdozent
pH	pondus Hydrogenii
pmol	Picomol
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
S	sense
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TE	Tris-EDTA-Puffer
TRIM 32	Tripartite motif protein 32
Tris	Trometamol
TU	Technische Universität
U	Unit
UKG	Ultraschall-Kardiographie
UV	Ultraviolett
V	Volt
Vol	Volumen

A Einleitung

1 Muskeldystrophie: Allgemeine Definition

Der Begriff Muskeldystrophie wurde 1891 für genetisch determinierte, progressive und degenerative Muskelerkrankungen eingeführt (Erb 1891). Walton und Natrass definierten 1954 auf Basis von Untersuchungen an Großfamilien Untergruppen der Muskeldystrophien, unter anderem die Gruppe der Gliedergürtel-Muskeldystrophien (Walton und Natrass 1954), die aber vorerst als ein Überbegriff für die Fälle diente, die nicht eindeutig einer Muskeldystrophie vom Typ Duchenne oder dem fazio-skapulo-humeralen Typ zugeordnet werden konnten (Bushby 1999). Die Prävalenz einer Muskeldystrophie in beiden Geschlechtern wird auf 286×10^{-6} geschätzt, d.h. bei einem von 3.500 Menschen kann mit einer solchen Erkrankung gerechnet werden (Emery 1991).

2 Gliedergürtel-Muskeldystrophie: Definition und Historie

Die Gliedergürtel-Muskeldystrophien (LGMD) werden definiert als heterogene Gruppe genetisch determinierter, progressiver Muskelerkrankung mit primärem oder hauptsächlichem Befall der Becken- oder Schultergürtelmuskulatur. Sie können autosomal-dominant und -rezessiv vererbt werden. Für die Gliedergürtel-Muskeldystrophien gilt, dass die autosomal-dominant vererbten Formen mit einer Häufigkeit von 10% vertreten sind, der Hauptteil entfällt auf die autosomal-rezessiven Formen (Bushby und Beckmann 1995).

Die Klinik innerhalb dieser Gruppe ist sehr variabel, das Spektrum umfasst Formen mit frühem Erkrankungsbeginn und schwerem Verlauf, andere beginnen erst spät und zeigen einen nur langsamen oder leichten Verlauf (Vainzof und Zatz 2003).

Klarheit brachten erst die modernen molekulargenetischen Methoden, mit deren Hilfe eine exakte Diagnose auf der genetischen Ebene möglich wurde. Dies führte schließlich zur Einführung der Nomenklatur auf Basis des betroffenen Gens bzw. Proteins (Bushby und Beckmann 1995). So wurde es möglich, jeder genetisch definierten Gliedergürtel-Muskeldystrophie einen charakteristischen Phänotypen zuzuordnen, wobei mit Ausnahmen gerechnet und die mögliche intrafamiliäre Variabilität berücksichtigt werden muss (Beckmann 1999). Auch der Terminus Dysferlinopathie stammt aus dieser Entwicklung.

Bis heute sind mindestens sechs autosomal-dominante (LGMD1) und zehn autosomal-rezessive (LGMD2) Gliedergürtel-Muskeldystrophien definiert (Tabelle 1).

Muskeldystrophie	Genlokus	Protein	Lokalisation
LGMD1A	5q22-q34	Myotilin	Sarkomer
LGMD1B	1q11-q21	Lamin A/C	Nukleus
LGMD1C	3p25	Caveolin-3	Plasmamembran
LGMD1D	6q23	?	?
LGMD1E	7q	?	?
LGMD1F	7q	?	?
LGMD2A	15q15.1-q21.1	Calpain-3	Cytosol
LGMD2B/MM	2p13	Dysferlin	Plasmamembran
LGMD2C	13q12	γ -Sarkoglykan	Plasmamembran
LGMD2D	17q21-q21.33	α -Sarkoglykan	Plasmamembran
LGMD2E	4q12	β -Sarkoglykan	Plasmamembran
LGMD2F	5q33-q34	δ -Sarkoglykan	Plasmamembran
LGMD2G	17q11-q12	Telethonin	Sarkomer
LGMD2H	9q31-q34.1	TRIM 32	Cytosol
LGMD2I/CMD1C	19q13.3	FKRP	Cytosol
LGMD2J	2q	Titin	Sarkomer

Tab. 1: Übersicht der Gliedergürtel-Muskeldystrophien mit Genorten und Proteinen (Vainzof und Zatz 2003, Laval und Bushby 2004).

Eine schematische Übersicht über die Lokalisation der betroffenen Proteine an der Plasmamembran der Muskelzelle findet sich in Abbildung 1.

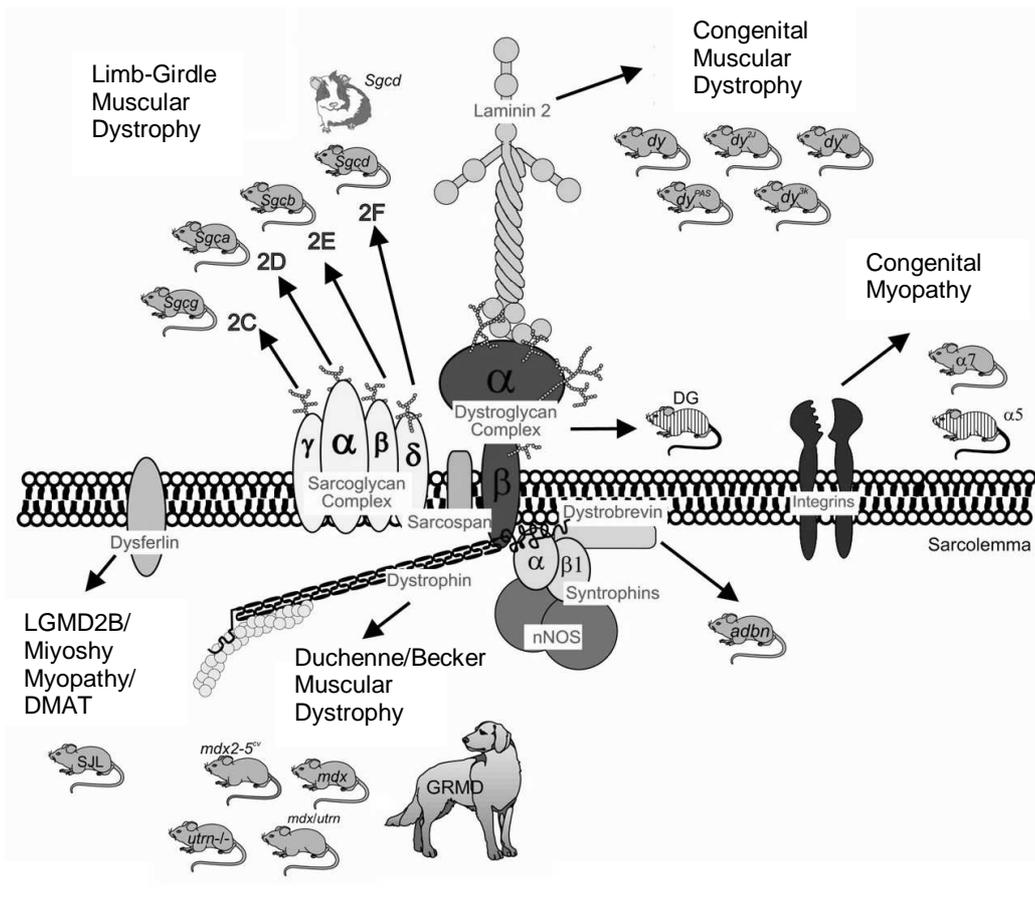


Abb. 1: Schematische Übersicht der an der Plasmamembran der Muskelzelle lokalisierten Proteine (vgl. Tab. 1). Tiermodelle für Muskeldystrophien sind ebenfalls dargestellt (Allamand und Campbell 2000).

3 Das Krankheitsbild der Dysferlinopathie und seine Phänotypen

Die Dysferlinopathie stellt einen autosomal-rezessiven Subtyp der Gliedergürtel-Muskeldystrophien dar und kommt in verschiedenen phänotypischen Ausprägungen vor. Entsprechend kann die betroffene Muskulatur ein proximales oder distales Verteilungsmuster zeigen. Die Patienten zeigen typischerweise eine normale motorische Entwicklung während der Kindheit (Mahjneh et al. 1996, Miyoshi et al. 1986). Die Erkrankung beginnt in der Regel am Ende des zweiten Lebensjahrzehnts, wobei intrafamiliäre Abweichungen von bis zu 10 Jahren vorkommen (Argov et al. 2000) und auch ein Krankheitsbeginn erst in der 3. oder 4. Lebensdekade oder noch später berichtet wird (Mahjneh et al. 2001, Cagliani et al. 2003). Es ist zu beachten, dass es unabhängig von der Verteilung der befallenen Muskulatur im Verlauf der Erkrankung zum Übergriff auf die jeweils noch nicht betroffenen Muskelgruppen kommt.

Eine Differenzierung in einen proximalen oder distalen Typ ist dann nicht mehr möglich. In seltenen Fällen kann es auch zu einem gleichzeitigen Befall von proximalen und distalen Muskeln kommen (Argov et al. 2000). Die folgenden Phänotypen wurden bisher beschrieben.

3.1 Die Gliedergürtel-Muskeldystrophie Typ 2B (LGMD2B)

Die klinischen Symptome der LGMD2B beginnen in der Regel mit einer Schwäche und Atrophie der proximalen Muskulatur der unteren Extremität, erste Probleme fallen beim Rennen und Treppensteigen auf. Im Verlauf ist auch der Zehenspitzenang eingeschränkt, es kommt des weiteren zur Schwäche auch im Bereich des Schultergürtels, wobei die distale Armmuskulatur spät und nur gering betroffen ist. In schweren Fällen sind die Patienten im Durchschnitt um das 4. Lebensjahrzehnt an den Rollstuhl gebunden (Mahjneh et al. 2001). Häufig findet sich aber eine nur langsam progrediente Verlaufsform, die Lebenserwartung ist nicht verkürzt. CT-Untersuchungen können bereits frühzeitig eine subklinische Beteiligung des M. gastrocnemicus aufzeigen, wobei die proximale Muskulatur für gewöhnlich schwerer betroffen ist. (Mahjneh et al. 1996). Eine transiente Wadenhypertrophie (bis zu zwei Jahre Dauer) im frühen Krankheitsstadium ist möglich (Mahjneh et al. 2001).

3.2 Die Miyoshi Myopathie (MM)

Dieser Phänotyp wurde zuerst von Miyoshi bei japanischen Patienten als distale Muskeldystrophie beschrieben. Das Initialsymptom ist eine Schwäche des M. gastrocnemicus und damit ein eingeschränkter Zehenspitzenang. Im Verlauf der Krankheit kommt es zur Schwäche und Muskelatrophie der proximalen Bein- und Unterarmmuskulatur mit ersten Problemen beim Treppensteigen (Miyoshi et al. 1986). Als seltenes Symptom tritt eine subakute, schmerzhafte und vorübergehende Schwellung der Waden auf (Argov et al. 2000). Die Progredienz ist langsam, ein Gehstock oder Rollstuhl sind bei den meisten Patienten erst im 3. oder 4. Lebensjahrzehnt notwendig.

Westliche Patienten zeigen z.T. einen ungünstigen Verlauf, bei dem bereits ein Jahr nach Beginn die Armmuskulatur mitbefallen sein kann. Im Durchschnitt sind 10 Jahre nach den ersten Symptomen 33% der Patienten an den Rollstuhl gefesselt, früher als bei japanischen MM-Patienten oder bei der LGMD2B (Linssen et al. 1997).

3.3 Die distale anteriotibiale Muskeldystrophie (DMAT)

Dieser Phänotyp wurde zuerst von Liu et al. beschrieben: Betroffen ist anfangs die distale Beinmuskulatur, hier allerdings zuerst in tibial anterioren Muskeln (Liu et al. 1998). Die Krankheit verläuft rasch progressiv und greift auf die proximale Muskulatur der unteren und oberen Extremität über. Die Patienten sind 11-22 Jahre nach Krankheitsausbruch an den Rollstuhl gebunden. Der M. gastrocnemicus ist selbst nach langer Krankheitsdauer nur gering betroffen, womit sich dieser Phänotyp deutlich von der MM abgrenzt (Illa et al. 2001).

3.4 Die Epidemiologie der Dysferlinopathie

Bis auf einzelne Studien gibt es epidemiologisch keine eindeutigen Daten über die Häufigkeit der Dysferlinopathie: Nach Untersuchungen in der brasilianischen Bevölkerung wurde LGMD2B nach der LGMD2A als zweithäufigste Form der autosomal-rezessiv vererbten LGMDs eingeschätzt (Passos-Bueno et al. 1996, Vainzof et al. 2001), gleiches gilt für die japanische Bevölkerung (Tagawa et al. 2003). Die Prävalenz der Miyoshi Myopathie wird in Japan auf 8 von $3,5 \times 10^6$ oder 1:440.000 geschätzt (Bejaoui et al. 1995).

Die Verbreitung von LGMD2B und MM ist nicht geographisch oder ethnisch begrenzt (Passos-Bueno et al. 1996, Bejaoui et al. 1995, Flachenecker et al. 1997, Linszen et al. 1997).

3.5 Die historische Entwicklung des Krankheitsbildes der Dysferlinopathie

Da sich die bisherige Klassifikation der Muskeldystrophien vor allem auf das Verteilungsmuster der betroffenen Muskulatur bezieht, stellt die Dysferlinopathie mit ihren verschiedenen Phänotypen mit proximalem (LGMD2B) und distalem Befall (MM, DMAT) eine Herausforderung an diese Form der Unterteilung dar. Des weiteren erschwert die unterschiedliche und teilweise auch überlappende Klinik der Krankheiten in dieser Gruppe eine genaue Diagnose, weshalb die Phänotypen der Dysferlinopathie zunächst als eigene Krankheitsbilder galten:

Die Gliedergürtel-Muskeldystrophie Typ 2B (LGMD2B) wurde erstmals 1994 definiert, als eine Muskeldystrophie durch Haplotypenanalyse bei zwei Familien unterschiedlicher ethnischer Herkunft auf einen Bereich auf Chromosom 2p13 zurückgeführt werden konnte (Bashir et al. 1994). Dies wurde durch weitere Untersuchungen (Passos-Bueno et al. 1995) und Positionsklonierung (Bashir et al. 1996) bestätigt.

Im gleichen Zeitraum wurde für die Miyoshi Myopathie (MM) ebenfalls durch Haplotypenanalyse und Positionsklonierung der genetische Locus auf Chromosom 2p13 bestimmt (Bejaoui et al. 1995, Bejaoui et al. 1998), was eine Co-Lokalisation von MM und LGMD2B im gleichen Bereich wahrscheinlich macht. Für die MM wurde jedoch auch eine genetische Heterogenität gezeigt, für die ein Locus des betroffenen Gens auf Chromosom 10 wahrscheinlich ist (Linssen et al. 1998).

Ein weiterer Hinweis auf eine Verbindung zwischen LGMD2B und MM auf genetischer Ebene wurde 1996 entdeckt. In zwei Großfamilien wurde das Vorliegen von Patienten mit LGMD2B einerseits und MM andererseits beschrieben, wobei die Betroffenen in beiden Stammbäumen mit LGMD2B und MM-Phänotypen die selben Haplotypen zeigten (Weiler et al. 1996, Illarioshkin et al. 1996).

Die Co-Lokalisation der LGMD2B und der MM auf den gleichen Bereich des Chromosoms 2p13 konnte mit der Klonierung des für beide Phänotypen verantwortlichen Dysferlin-Gens nachgewiesen werden (Liu et al. 1998, Bashir et al. 1998). Liu beschrieb schließlich noch den dritten hier lokalisierten Phänotypen, die distale anteriotibiale Muskeldystrophie. Die hier gezeigte Entwicklung des Krankheitsbildes der Dysferlinopathie unterstreicht die Bedeutung der molekularen Diagnostik.

Da die unterschiedlichen Phänotypen innerhalb eines Stammbaums auf ein und dieselbe Mutation zurückgeführt werden können, müssen weitere modifizierende Faktoren oder Gene für die Unterschiede verantwortlich sein (Weiler et al. 1999, Illarioshkin et al. 2000, Ueyama et al. 2001, Nakagawa et al. 2001, Aoki et al. 2001). Die Entwicklung unterschiedlicher Phänotypen kann selbst bei Geschwistern beobachtet werden (Saito et al. 2002, Tagawa et al. 2003).

4 Proteininteraktionen

Als Erklärungsansatz für die unterschiedlichen Phänotypen finden sich in der Literatur Hinweise auf Proteininteraktionen mit Caveolin-3 und Calpain-3. Des Weiteren wurde kürzlich eine mögliche Beteiligung der Annexine-1 und -2 festgestellt.

4.1 Dysferlin und Caveolin-3

Mutationen des Caveolin-3-Gens resultieren in unterschiedlichen Erkrankungen. Zum einen verursachen sie die autosomal-dominant vererbte LGMD1C (Minetti et al. 1998), die Rippling Muscle Disease (Betz et al. 2001) und die HyperCKämie (Carbone et al. 2000). Auch hier konnte nachgewiesen werden, dass identische Mutationen in verschiedenen Familien zu unterschiedlichen Phänotypen führen, die mit (LGMD1C) und ohne Muskelschwäche (Rippling Muscle Disease, HyperCKämie) symptomatisch werden (Betz et al. 2001).

Bei der LGMD1C und der Rippling Muscle Disease kann es zu einer sekundär verminderten Immunfärbung des Dysferlins kommen (Matsuda et al. 2001, Kubisch et al. 2003).

4.2 Dysferlin und Calpain-3

Bei Calpain-3 handelt es sich um die muskelspezifische, kalziumaktivierte neutrale Protease 3, eine Cysteinprotease (Richard et al. 1995). Bei Mutationen des Calpain-3 kommt es zu einem Verlust der proteolytischen Aktivität (Ono et al. 1998). Folge ist die Gliedergürtel-Muskeldystrophie vom Typ 2A (LGMD2A). Diese Krankheit beginnt in der Regel im ersten oder zweiten Jahrzehnt, kann aber auch erst später im Erwachsenenalter symptomatisch werden. Typisch sind eine Muskelatrophie vor allem im Beckengürtelbereich, eine variable Progression, Kontrakturen und bei schweren Verläufen auch respiratorische Komplikationen (Bushby 1999, Pollitt et al. 2001).

In Studien wurde bei Patienten mit Dysferlinopathie mit den Phänotypen der LGMD2B und MM in einigen Fällen eine sekundäre Abschwächung von Calpain-3 nachgewiesen (Anderson et al. 2000). Dies ist ein Hinweis auf die Interaktion zwischen Calpain-3 und Dysferlin (Vainzof et al. 2001, Fanin et al. 2001).

4.3 Dysferlin und Annexin-1 und -2

Annexine sind Kalzium und Phospholipide bindende Proteine, die für Membrantransport, transmembranöse Kanalaktivität, Phospholipase A2-Inhibition und Zellmatrixinteraktionen von Bedeutung sind (Raynal und Pollard 1994). In Abhängigkeit von der Kalziumkonzentration aggregieren sie an der cytosolischen Seite der Plasmamembran intrazelluläre Vesikel und sog. Lipidrafts (Babiychuk und Draeger 2000).

Für Annexine und Dysferlin ist eine kalziumabhängige Interaktion und eine Co-Lokalisation an der Plasmamembran bekannt. Des Weiteren sind sie in der Co-Immunopräzipitation gemeinsam nachweisbar (Lennon et al. 2003).

5 Der Pathomechanismus bei Dysferlindefizienz

Erste im Elektronenmikroskop feststellbare pathologische Veränderungen bei einer Dysferlinopathie sind kleine Defekte der Plasmamembran sowie mehrere Schichten kleiner subsarkolemmaler Vesikel im Bereich dieser Defekte (Selcen et al. 2001). Denkbar ist hier, dass mutiertes Dysferlin-Protein nicht an der Membran ansetzen kann und eine Fusion der Vesikel mit der Membran verhindert wird. Eine vorstellbare Hypothese ist auch die sekundäre Verminderung des Dysferlins am Sarkolemma bei Vorliegen von fehlerhaften, mit Dysferlin an der Membran assoziierenden Proteinen (Tagawa et al. 2003). Eine Folge des fehlerhaften Mechanismus könnte dann die von Piccolo festgestellte vermehrte Akkumulation von Dysferlin in den subsarkolemmalen Vesikeln sein (Piccolo et al. 2000).

Weitere Rückschlüsse ergaben sich im Tierversuch: Im Vergleich zwischen gesunden und mdx-Mäusen bzw. Dysferlin-defizienten Mäusen zeigte sich, dass Membrandefekte bei den beiden ersteren schnell durch Fusionsereignisse verschlossen werden, während dies bei den Dysferlin-defizienten Mäusen nicht oder nur stark verlangsamt geschieht. Allerdings kam es auch bei den letzteren zu einer Anhäufung subsarkolemmaler Vesikel im Bereich der Membrandefekte. Dies erhärtete den Verdacht, dass Dysferlin die Fusion von Vesikeln mit der Plasmamembran durch Interaktion mit Dysferlin oder anderen Proteinen ermöglicht (Bansal et al. 2003) und im Sinne eines Reparaturmechanismus zum Erhalt der strukturellen Integrität der Plasmamembran der Muskelzelle benötigt wird.

Bei Vorliegen von mutiertem Dysferlin kann diese Reparatur nicht oder nur in geringem Maße ablaufen, die Zelle ist nicht mehr in der Lage, Membranschäden zu verschließen und es kommt schließlich zum Zelltod (Ellis 2003).

6 Die Diagnose der Dysferlinopathie

Da die Gruppe der Gliedergürtel-Muskeldystrophien sehr heterogen ist und bei der Dysferlinopathie proximale und distale Verlaufsformen möglich sind, ist eine sichere Diagnose nur auf molekularer Ebene möglich. Dabei müssen Anamnese, körperliche Untersuchung, technische Untersuchungen, Histologie, Proteindiagnostik (Immunhistologie,

Immunoblot) sowie Haplotypenanalyse (Linkage) in einem schrittweise ablaufenden diagnostischen Prozess berücksichtigt werden (zusammengefasst in Abbildung 2).

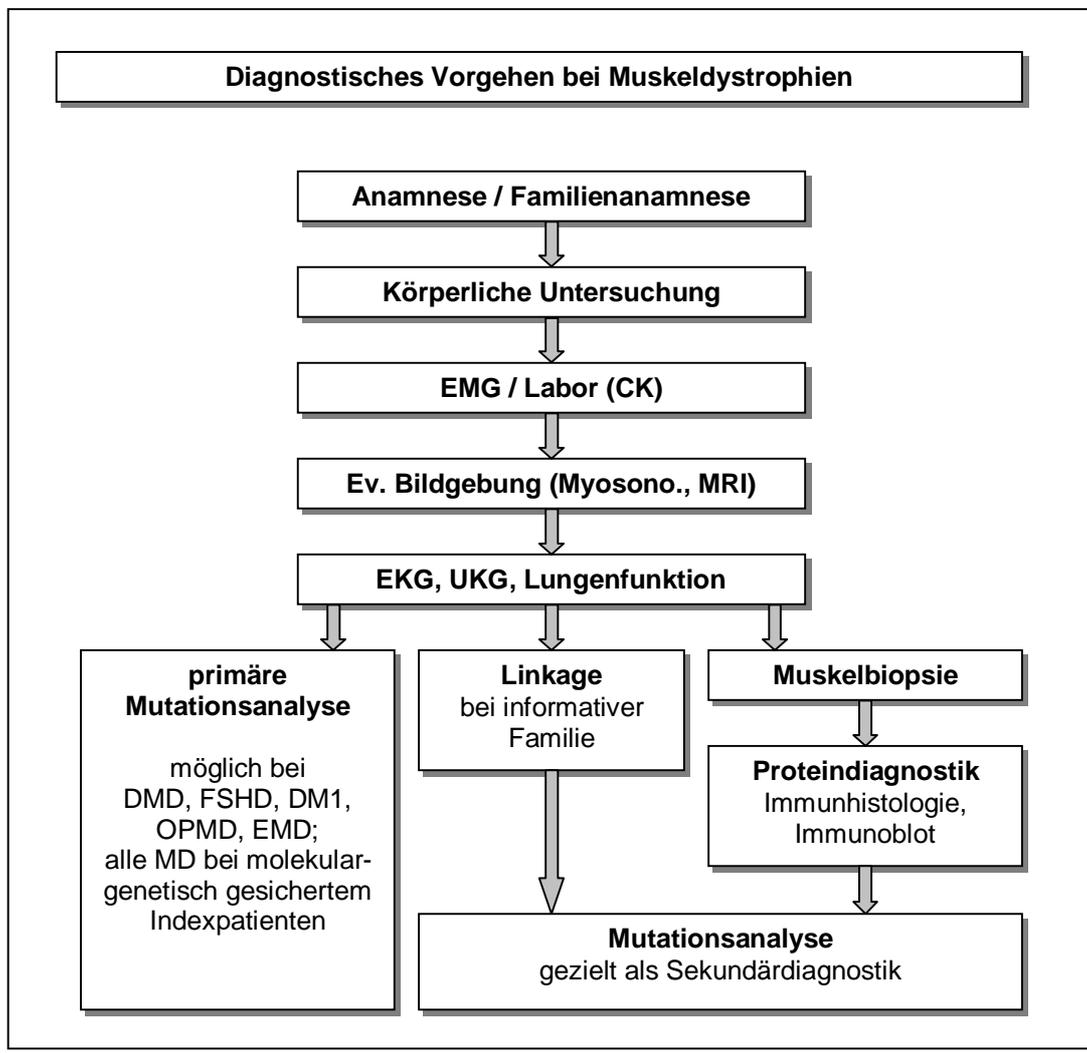


Abb. 2: Diagnostisches Vorgehen bei Muskeldystrophien (Walter et al. 2002).

Differentialdiagnostisch kommen bei der Dysferlinopathie die anderen LGMD-Subtypen, die distalen Myopathien, sowie die vom Verteilungsmuster der Paresen ähnliche Dystrophinopathie in Frage. Des weiteren können auch entzündliche Myopathien (Gallardo et al. 2001, Fanin und Angelini 2002), HyperCKämien (Linssen et al. 1997, Angelini et al. 2000), Polymyositis (Bushby 2000), mitochondriale oder metabolische Myopathien und auch die spinale Muskelatrophie (Bushby 1998) mögliche Differentialdiagnosen darstellen.

Wie in Abbildung 2 zusammengefasst, wird zunächst auf Grundlage der Anamnese und der körperlichen Untersuchung durch den Zeitpunkt des Krankheitsbeginns und durch das Verteilungsmuster der proximal oder distal betroffenen Muskeln im zeitlichen Verlauf die Verdachtsdiagnose einer LGMD oder distalen Myopathie gestellt. Im Rahmen der

Krankheitsgeschichte ist auch die Familienanamnese zu erheben. Diese kann die Unterscheidung zwischen autosomal-dominant und -rezessiv vererbten Formen der LGMD und der X-chromosomal-rezessiv vererbten Dystrophinopathie (DMD) ermöglichen.

Im nächsten Schritt folgen die technischen Untersuchungen (Abbildung 2). Einen wichtigen Hinweis gerade auf die Dysferlinopathie liefert neben dem Verteilungsmuster und dem Krankheitsbeginn im frühen Erwachsenenalter die Untersuchung der Serum-CK (Bushby 1999): Bei allen Phänotypen kommt es zu einer deutlichen CK-Erhöhung um das Zehn- bis Hundertfache der Norm (Mahjneh et al. 1996, Miyoshi 1986, Illa et al. 2001). Eine geringere CK-Erhöhung kann auch bei präklinischen und heterozygoten Patienten auffällig sein (Weiler et al. 1999, Argov et al. 2000, Illarioshkin et al. 2000). Im Verlauf der Krankheit kann der CK-Wert mit zunehmender Muskelschwäche und -atrophie wieder abfallen (Mahjneh et al. 2001). Die CK-Erhöhung und die Schwäche des M. gastrocnemicus im frühen Erwachsenenalter gelten als Hauptkriterien der MM (Miyoshi 1986).

Die elektromyographische Untersuchung ergibt typische myopathische Befunde (Mahjneh et al. 1996, Linssen et al. 1997). Bildgebende Verfahren wie die Myosonographie und Kernspintomographie können ergänzend eingesetzt werden, um das Verteilungsmuster der betroffenen Muskulatur zu untersuchen und um geeignete Stellen für die Muskelbiopsie zu finden (Walter et al. 2002).

In der Muskelbiopsie finden sich die charakteristischen Veränderungen eines primären myopathischen Prozesses mit Variation des Faserkalibers, hypo- und hypertrophe Fasern, Nekrosen, sowie Infiltration von Fett- und Bindegewebe (Mahjneh et al. 1996, Flachenecker et al. 1997, Linsen et al. 1997). Ebenfalls relativ häufig sind entzündliche Infiltrate (Rowin et al. 1999, McNally et al. 2000, Illa et al. 2001), was die Abgrenzung zu den entzündlichen Myopathien erschweren kann. Die Infiltrate enthalten vorwiegend Makrophagen und CD4+ T-Zellen. Sie sind oft perivaskulär und, im Sinne einer sekundären Reaktion auf die Nekrose, um nekrotische Muskelfasern lokalisiert. Diese Veränderungen kommen in allen drei Phänotypen vor, eine Korrelation mit dem Genotyp konnte nicht nachgewiesen werden (Gallardo et al. 2001, Fanin und Angelini 2002).

Bei der Dysferlinopathie besteht keine extramuskuläre Organbeteiligung: Es kommt in der Regel weder zur Kardiomyopathie, noch zur Beteiligung der Atemmuskulatur, diese sollten

aber durch EKG und eine Überprüfung der Lungenfunktion auf jeden Fall ausgeschlossen werden. Kontraktoren sind sehr selten. Auch eine Intelligenzminderung kann nicht festgestellt werden (Beckmann 1999).

Bei großen Familien bietet sich des Weiteren die Haplotypenanalyse (Linkage) an, um den Genlocus näher einzugrenzen, bzw. um andere Muskeldystrophien auszuschließen (Bushby 1999). Bei dieser Untersuchung handelt es sich um eine Bestimmung von genetischen Markern, die auf dem Chromosom nahe bei dem betroffenen Gen lokalisiert sind und häufig mit diesem gemeinsam weitervererbt werden.

Entscheidend im diagnostischen Prozess für die Dysferlinopathie (siehe Abbildung 2) ist die Proteindiagnostik, mit deren Hilfe man auch ohne die Haplotypenanalyse das wahrscheinlich betroffene Gen identifizieren kann, um dieses dann der Mutationsanalyse zuzuführen (Anderson 1996). Hier werden zunächst eine Vielzahl von Proteinen immunhistologisch überprüft. Bei einer Abschwächung oder dem fehlenden Nachweis des Proteins erfolgt ein weiterer Test mittels Immunoblot zur Bestätigung.

Bei der Untersuchung ist zu beachten, dass es gerade bei den Proteinen Calpain-3, Caveolin-3 und Dysferlin (siehe Tabelle 1) aufgrund von Interaktionsmechanismen zu sekundären Reduktionen kommen kann (Matsuda et al. 2001, Pogue et al. 2001, Anderson et al. 2000, Cagliani et al. 2003). Eine Reduktion des Proteins sollte im nächsten Schritt eine genetische Analyse des Dysferlin-Gens nach sich ziehen (Pogue et al. 2001). Es gibt keine nachweisbaren Unterschiede in der Abschwächung der Dysferlin-Bande zwischen den verschiedenen Phänotypen der Dysferlinopathie (Weiler et al. 1999).

Durch die Proteinanalyse geführt, folgt als letzter Schritt die genetische Analyse im betroffenen Gen und der direkte Nachweis der Mutationen (Bushby 1999). Mit dem erfolgreichen Nachweis ist die Diagnose gesichert.

Eine direkte Mutationsanalyse bei der Dysferlinopathie ohne vorherige Muskelbiopsie ist bislang nur bei einer molekulargenetisch gesicherten Erkrankung eines Indexpatienten in der Familie indiziert (siehe Tabelle 2).

7 Die Therapie von Muskeldystrophien

Die Therapie der Muskeldystrophien teilt sich in die unterstützenden Maßnahmen und die medikamentöse Behandlung zur symptomatischen Therapie. Kausale genetische Therapieansätze befinden sich noch im Forschungsstadium.

Das Ziel der Therapie ist dementsprechend vorrangig der Erhalt der Selbstständigkeit und der Selbstversorgung des Patienten, sowie die Vermeidung von Komplikationen durch die muskuläre Schwäche und die verschiedenen Formen der Beteiligung von Herz und Lunge.

Eine unterstützende Maßnahme ist die Physiotherapie zum Erhalt der Muskelfunktion und zur Kontrakturprophylaxe (Forst et al. 1984). Da der dystrophe Muskel empfindlicher auf Beanspruchung reagiert, sollte die Muskulatur nicht überbeansprucht, andererseits aber auch nicht übermäßig geschont werden (Fanin und Angelini 2002).

Kommt es zu Kontrakturen, können orthopädisch-chirurgische Eingriffe notwendig werden. Des Weiteren können Hilfsmittel wie Beinorthesen, Rollstühle oder Spezialbetten die Lebensqualität bei fortschreitender Krankheit verbessern. Bei Beteiligung der Herz- und Atemmuskulatur können ein entsprechendes Monitoring sowie der Einsatz von Herzschrittmachern und gegebenenfalls künstliche Beatmung notwendig werden (Walter und Lochmüller 2001).

Auch psychologische, arbeitsmedizinische und sozialpädagogische Aspekte sowie genetische Beratung gilt es zu berücksichtigen, um dem Patienten bei der Verarbeitung der Erkrankung, den Problemen im sozialen Leben und am Arbeitsplatz und bei der Familienplanung zu helfen. Darüber hinaus sollten Patienten und Angehörige auf bestehende Selbsthilfegruppen hingewiesen werden.

Im medikamentösen Bereich gibt es trotz vieler Angriffspunkte nur wenige Erfolg versprechende Ansätze, obwohl zahlreiche Substanzen in Studien untersucht wurden. So zeigten Studien mit Anabolika, Wachstumsfaktoren, Aminosäuren oder Aminoglykosiden keine oder nur geringe Verbesserungen, während die Nebenwirkungen mitunter schwerwiegend sein können (Walter und Lochmüller 2001, Karpati und Lochmüller 2001).

Bei der Muskeldystrophie Duchenne haben sich am ehesten die Kortikosteroide als Erfolg versprechend erwiesen. Therapieversuche mit Prednison ergaben eine Verlangsamung der Krankheitsprogression (Brooke et al. 1987) und eine Verbesserung von Muskelkraft und -funktion (Mendell et al. 1989, Fenichel et al. 1991). Ebenso positive Effekte bei geringeren

Nebenwirkungen wurden bei der Gabe von Deflazacort beschrieben (Mesa et al. 1991, Bonifati et al. 2000). Deflazacort zeigte auch in einem Fall von α -Sarkoglykanopathie (LGMD2D) eine positive therapeutische Wirkung (Angelini et al. 1998).

Des Weiteren wurde auch für die Gabe von Kreatin-Monohydrat eine signifikante Verbesserung der Muskelkraft und der Alltagsaktivitäten bei Patienten mit verschiedenen Formen von Muskeldystrophien nachgewiesen (Walter et al. 2000).

Für Muskeldystrophien bestehen bislang keine kausalen Therapiemöglichkeiten. Zwar werden verschiedene molekulare Therapiekonzepte erforscht (Dubowitz 2000, Hartigan-O'Connor und Chamberlain 2000, Walter und Lochmüller 2001), doch gilt es noch viele technische und methodische Hürden zu überwinden, bevor eine kurative Behandlung etabliert werden kann.

B Zielsetzung der Arbeit

Ziel der Arbeit ist es zunächst, eine funktionelle molekulare Diagnostik der Dysferlinopathie zu etablieren. Auf Basis der molekularen Charakterisierung soll dann einerseits dem einzelnen Patienten eine eindeutige Diagnose mit allen daraus entstehenden Konsequenzen geboten, und andererseits ein Beitrag zum Verständnis der Vorgänge in der Muskelzelle geleistet werden.

1 Etablierung eines Diagnosesystems

Aus Zellen gewonnene RNA wurde revers transkribiert und die gewonnene cDNA durch PCR amplifiziert, die Produkte wurden in der Agarose-Gelelektrophorese visualisiert, aufgereinigt und kontrolliert. Mit Hilfe der fluoreszenzgestützten Sequenzanalyse konnten die genetischen Information des Patienten mit dem Originaltransskript verglichen und Mutationen aufgedeckt werden.

Dieses System bietet standardisierte und qualitätssichernde Bedingungen und liefert verlässliche und reproduzierbare Ergebnisse zur Sicherung der molekularbiologischen Diagnose. So wurde die genetische Erforschung der Dysferlinopathie am untersuchten Patientengut ermöglicht.

2 Klinische und therapeutische Bedeutung der molekularen Diagnostik

Ein bedeutsames Problem in der Krankheitsgruppe der Muskeldystrophien ist die oft unzureichende klinische Abgrenzbarkeit zwischen den einzelnen Subtypen der Erkrankung. Phänotypische Überschneidungen (Walter et al. 2002) und individuell abweichender Krankheitsverlauf machen eine klinische Zuordnung schwierig, doch sind je nach dem betroffenen Gen Verlauf, Prognose, Vererbbarkeit und Behandlungsmöglichkeiten der jeweiligen Muskeldystrophie-Unterform sehr unterschiedlich.

Die molekulare Diagnose hat dementsprechend Auswirkungen auf die weitere Lebens-, Berufs- und Familienplanung des Patienten, ermöglicht die genetische Beratung der Familie und die Prävention von Komplikationen.

Bezüglich der bisher eher unbefriedigenden Therapieoptionen kann eine genaue genetische Charakterisierung der Erkrankung dazu beitragen, dass Patienten in klinische Therapiestudien eingeschlossen werden können, bzw. dass in der Zukunft eine molekulare Therapie ermöglicht werden kann.

3 Beitrag zum Verständnis der Pathophysiologie

Der Formenkreis der dystrophen Muskelerkrankungen wächst beständig, zur Zeit sind etwa 30 Genorte für Muskeldystrophien bekannt (Walter et al. 2002), davon entfallen alleine 16 auf den Bereich der Gliedergürteldystrophien (Tabelle 1).

Defekte Proteine finden sich an der Plasmamembran (Abbildung 1), am Sarkomer, am Nukleus und im Cytosol, doch die pathogenetischen Vorgänge, die jeweils zum Bild der Muskeldystrophie führen, sind noch nicht genau erforscht.

Wie die Entdeckung des Dystrophin-Glykoprotein-Komplex deutlich macht, haben nicht nur die einzelnen Defekte, sondern auch Proteininteraktionen eine große pathogenetische Bedeutung.

Mit der genetischen Charakterisierung soll ein Beitrag geleistet werden, die Pathogenese der Dysferlinopathie aufzuklären, Proteininteraktionen zwischen Dysferlin und anderen Proteinen nachzuweisen und das Modell von den Abläufen in der Muskelzelle zu erweitern.

C Material und Methoden

1 Geräte und Materialien

1.1 Geräte

1.1.1 Geräte für das molekularbiologische Arbeiten

Flachbett-Elektrophoreseapparatur (Max Submarine Unit HE 99X und Submarine Agarose Gel Unit HE 33, Hoefer Scientific Instruments, San Francisco, USA)

Thermocycler (Mastercycler Personal 5332 Eppendorf, Hamburg, BRD)

Spannungsquelle (DC PS 3000, Hoefer Scientific Instruments, San Francisco, USA)

Spektralphotometer (DU 640, Beckman Coulter Inc., Fullerton, Kalifornien, USA)

UV-Leuchttisch (UV IL-350-L 366 nm, Bachofer, Reutlingen, BRD)

Eagle Eye II Still Video (Stratagene, La Jolie, Kalifornien, USA)

1.1.2 Sonstige Geräte

Einmalskalpelle (Feather Safety Razors Co. Ltd, Japan)

Eismaschine (ZBE 250, Ziegra, Isernhagen, BRD)

Kühlzentrifugen (Rotanta TRC, Hettich, Tuttlingen, BRD)

Präzisionswaagen (Sartorius 1412 MP8-1, Göttingen, BRD)

Porzellanmörser (Haldenwanger Tech. Keramik GmbH & Co. KG, Berlin, BRD)

PH-Meter (HI 9321 Microprocessor pH Meter, Hanna Instruments, Kehl, BRD)

Tischzentrifugen (Centrifuge 5417R, Eppendorf, Hamburg, BRD)

Pipetten (Eppendorf Research, Eppendorf, Hamburg, BRD)

Pipet-aid (Drummond Scientific Company, Broomall, Pennsylvania, USA)

Ultra Turrox (Pellet Pestle, Kimble Kontes, New Jersey, USA)

Vortex (Genie 2, Scientific Industries, Bohemia, New York, USA)

Wärmeblock (Dri Block DB-3A, Techne, Cambridge, GB)

Wasserbad-Heizelement (Haake Fisons DC 1, Karlsruhe, BRD)

Wasserbad (Haake 5P, Haake, Karlsruhe, BRD)

1.2 Material

Alle Chemikalien waren von analytischer Reinheit und wurden von den Firmen Merck KGaA (Darmstadt) und Carl Roth GmbH & Co (Karlsruhe) bezogen. Die Medien, Lösungen und Puffer wurden üblicherweise mit deionisiertem Wasser (H_2O_{deion}), hergestellt in der hauseigenen Anlage des Genzentrums, angesetzt. Die Verwendung von H_2O_{deion} ist im Text vermerkt. Die Materialien, einschließlich Chemikalien, verwendeter Kits und Enzyme werden im Rahmen der methodischen Kapitel erwähnt und ihre Zusammensetzung dort erläutert.

1.3 Computerprogramme

Microsoft Power Point 98 (Microsoft GmbH, Unterschleißheim, BRD)

Microsoft Excel 98 (Microsoft GmbH, Unterschleißheim, BRD)

Microsoft Word 98 (Microsoft GmbH, Unterschleißheim, BRD)

Abiprism Edit View 1.0.1 (Perkin-Elmer Corp., Wellesley, Massachusetts, USA)

Amplify 1.0 (Bill Engels, Wisconsin, USA)

MacDNAsis Pro 1.0 (Hitachi Software Engineering, Kalifornien, USA)

DNA Strider 1.0 (Christian Marck, Frankreich)

1.4 Patienten und Probenmaterial

Die Patienten-Rekrutierung erfolgte durch Herrn Prof. Dr. H. Lochmüller und Frau PD Dr. M.C. Walter am Friedrich-Baur-Institut der LMU München, Herrn PD Dr. H. Schreiber an der Poliklinik für Neurologie der Universität Ulm und Herrn PD Dr. M. Vorgerd an der Neurologischen Klinik und Poliklinik der Ruhr-Universität Bochum. Patientenmaterial (EDTA-Vollblut, Muskelgewebe, genomische DNA) wurde von den beteiligten Kliniken zur Untersuchung eingesandt, bzw. im Friedrich-Baur-Institut entnommen. Zusätzlich wurde auch Material (EDTA-Vollblut, genomische DNA) von Angehörigen und Normalkontrollen in die weiteren Untersuchungen einbezogen. Alle durchgeführten Untersuchungen erfolgten nach Aufklärung und mit schriftlichem Einverständnis der Patienten.

1.4.1 Muskelgewebe und –zellen

Die zur molekulargenetischen Analyse auf Ebene der cDNA verwendeten Muskelgewebeprobe stammen von Patienten mit klinischem Verdacht auf eine Gliedergürteldystrophie bzw. distale Muskeldystrophie. Die Proben wurden im Rahmen einer offenen diagnostischen Muskelbiopsie entnommen. Aus einem kleinen Anteil des Biopsats wurden im Friedrich-Baur-Institut Satellitenzellen extrahiert, die in Zellkultur zu Myoblasten heranreifen (genehmigt durch die Ethikkommission der LMU München, Antrag Nr. 107/01). Diese Myoblasten wurden durch 2- bis 5-tägige Zugabe eines Differenzierungsmediums zu multinukleären Myotuben ausdifferenziert. Die fusionierten Myotuben wurden geerntet und bei -20°C bis zur Präparation der RNA aufbewahrt.

1.4.2 Blutproben

Zur molekulargenetischen Analyse auf Ebene der genomischen DNA wurde von den Patienten und ihren Angehörigen peripheres venöses Blut in EDTA- Blutbildröhrchen (10 ml) abgenommen.

2 Methoden

2.1 Extraktion der RNA

2.1.1 RNA-Extraktion aus Muskelbiopsat

2.1.1.1 Material

GSCN-Lösung:

Guanidinthiocyanat (5 g)	Merck KGaA, Darmstadt, BRD
Natrium-Laurylsarcosin (0.05)	Merck KGaA, Darmstadt, BRD
Natrium-Citrat, 1 M, pH 7 (0.15 ml)	Merck KGaA, Darmstadt, BRD
Mercaptoethanol (0.07 ml)	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, BRD
H ₂ O _{deion} (10 ml)	Genzentrum, München, BRD

RNAse-freies Wasser	Amersham, USA
Natrium-Acetat, 2 M, pH 4	Merck KGaA, Darmstadt, BRD
Natrium-Acetat, 3 M, pH 5	Merck KGaA, Darmstadt, BRD
AquaRoti-Phenol	Merck KGaA, Darmstadt, BRD
Roti-Phenol/Chloroform-Isolierung	Merck KGaA, Darmstadt, BRD
Chloroform	Merck KGaA, Darmstadt, BRD
Ethanol absolut	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, BRD
Ethanol 70%	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, BRD

2.1.1.2 Vorgehen

Die Extraktion der gesamtzellulären RNA erfolgte aus Muskelgewebe, das durch eine offene Muskelbiopsie gewonnen wurde. Die RNA-Präparation wurde entsprechend eines Standard-Protokolls durchgeführt (Chomczynski und Sacchi 1987).

Bei der Arbeit mit RNA wurde auf die RNAse-Freiheit der benutzten Materialien und Reagenzien geachtet, um einen Verlust von RNA während des Vorgangs zu minimieren. Zum Gewebeaufschluss wurde ein 2 bis 5 mm² großes, bei -80°C tiefgefrorenes Muskelgewebestück in einem auf Trockeneis gelagerten Mörser fein zerrieben, mit 500µl kalter GSCN-Lösung in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und mittels Ultra Turrox homogenisiert. Die festen Bestandteile wurden 10 min bei 14000 rpm und 4°C abzentrifugiert und der Überstand einer sauren Phenolbehandlung unterzogen.

Das entstehende Pellet wurde erneut in 400 µl GSCN-Lösung gelöst, mit 1 ml EtOH abs. gefällt und in 400 µl RNAse-freiem Wasser aufgenommen. Anschließend wurde eine Phenol-Chloroform-Extraktion (pH 7,5) durchgeführt. Das hier entstandene Pellet wurde mit 1 ml 70% Ethanol gewaschen, die so isolierte gesamtzelluläre RNA luftgetrocknet und bei 65°C für 5 min in 30 µl RNAse-freiem Wasser resuspendiert. Die RNA-Konzentration wurde

photometrisch bestimmt und die Güte der Isolierung über ein 2% Agarosegel kontrolliert. Die so gewonnen RNA wurde bei -80°C gelagert.

2.1.2 RNA-Extraktion aus Myotuben

2.1.2.1 Material

Qiagen RNEasy Kit

Qiagen GmbH, Hilden, BRD

Mercaptoethanol (für Kit-Puffer RLT)

Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, BRD

Ethanol absolut (für Kit-Puffer RPE)

Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, BRD

Ethanol 70%

Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, BRD

RNase-freies Wasser

Amersham, USA

2.1.2.2 Vorgehen

In der Kultur gezüchtete Myotuben wurden geerntet und die RNA mittels Qiagen RNEasy Kit nach Angaben des Herstellers extrahiert. Die RNA-Konzentration wurde photometrisch bestimmt und die Güte der Isolierung über ein 2% Agarosegel kontrolliert. Die so gewonnene RNA wurde bei -80°C gelagert.

2.2 DNA-Extraktion aus EDTA-Vollblut

2.2.1 Material

Qiagen Blood and Tissue Culture

Qiagen GmbH, Hilden, BRD

DNA Extraction Kit

Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, BRD

Isopropanol

Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, BRD

Ethanol 70%

TE-Puffer (pH 8,0):

Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, BRD

Tris-HCL (10 mM)

Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, BRD

Na₂EDTA (1 mM)

Genzentrum, München, BRD

H₂O_{deion}

2.2.2 Vorgehen

Mit Hilfe des Qiagen Kits wurde nach Angaben des Herstellers die genomische DNA extrahiert. Die DNA-Konzentration wurde photometrisch bestimmt und die Güte der Isolierung über ein 0,8% Agarosegel kontrolliert. Die so gewonnene DNA wurde bei 4°C in 100 µl TE-Puffer gelagert.

2.3 Photometrische Quantifizierung

Die photometrische Quantifizierung von RNA- oder DNA-Proben mit Hilfe eines UV-Spektralphotometers ermöglicht die Konzentrationsbestimmung der extrahierten Nukleinsäure. RNA und DNA verfügen über ein Absorptionsmaximum bei 260 nm. Gemessen wird die Extinktion bei 260 nm (Abschwächung des Lichtstrahls), die dem Produkt aus Schichtdicke (d) der Lösung, Extinktionskoeffizient (e) und der Konzentration der gelösten Substanz (C) entspricht. Durch Umstellung des Lambert-Beerschen Gesetz ($E = d \times e \times C$) kann die Konzentration bestimmt werden.

Für die Messung wurde die Nukleinsäure mit H_2O_{deion} verdünnt (1:100), die Messungen wurden in einer gering absorbierenden Glasküvette gegen eine Leerprobe durchgeführt.

2.4 Reverse Transkription von RNA in cDNA

2.4.1 Material

M-MuLV Reverse Transcriptase
und Reaktionspuffer
RNase-freies Wasser
PCR Nucleotide Mix

MBI Fermentas, St. Leon-Rot, BRD
Amersham, USA
Boehringer, Mannheim, BRD

2.4.2 Vorgehen

Bei der reversen Transkription bedient man sich eines viralen Enzyms, der Reversen Transkriptase. Dieses Enzym ermöglicht es RNA-Viren, ihr Genom in DNA zu übersetzen und es so in die genomische DNA einer Wirtszelle zu integrieren. Dieser Vorgang kann *in vitro* genutzt werden, um die extrahierte Gesamt-RNA in cDNA umzuschreiben. Es ist zu beachten, dass die cDNA nur die exonischen Anteile des Genoms besitzt.

Im ersten Schritt der reversen Transkription wurden bis zu 5 µg der RNA mit 20 pmol eines sequenzspezifischen Primers (hier die Antisense Primer 7, 13 oder 15) vermischt und mit RNase-freiem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 11 µl aufgefüllt. Um die Anlagerung des Primers an die RNA zu ermöglichen, wurde für 5 min bei 70°C inkubiert. Danach wurden 5 µl des Reaktionspuffers und 8 µl PCR Nucleotide Mix zugefügt und für 5 min bei 37°C inkubiert. Durch Zugabe von 2 µl (40 Units) M-MuLV Reverse Transcriptase wurde die Reaktion gestartet. Die Reverse Transkriptase übersetzt ausgehend von den an der RNA-Vorlage angelagerten Primern die RNA in cDNA (cDNA-Erststrangsynthese). Das Reaktionsgemisch wurde für 1 Stunde bei 37°C inkubiert, danach wurde die Reaktion durch zehnmütiges Erhitzen auf 70°C gestoppt. Im Reaktionsgefäß lag nun ein DNA/RNA-Doppelstrang vor, der in der PCR als Matrize verwendet werden konnte.

2.5 Polymerase-Kettenreaktion

2.5.1 Material

10x PCR-Puffer:

TrisHCl, pH 8,5 (100 mM)

MgCl₂ (15 mM)

KCl (500 mM)

BSA 1mg/ml

Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, BRD

PCR Nucleotide Mix

Taq DNA Polymerase

Boehringer, Mannheim, BRD

Boehringer, Mannheim, BRD

2.5.2 Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion

Das von Mullis entwickelte Verfahren der PCR beruht auf der *in vitro* Vermehrung definierter DNA-Fragmente (Mullis 1990). Hierbei wird ein Abschnitt eines doppelsträngigen DNA-Moleküls enzymatisch vervielfältigt. Der Abschnitt wird durch zwei Oligonukleotidprimer, die gegenläufig an denaturierte DNA-Stränge des Ausgangsmoleküls binden, definiert. Die Methode besteht aus wiederholten Zyklen von Denaturierung der DNA, Hybridisierung der Primer (Annealing) und der DNA-Synthese.

Bei dem untersuchten Gen wurden die gesamte kodierende Region (Exone) und Teile der flankierenden intronischen Regionen amplifiziert.

2.5.3 PCR-Reaktionsbedingungen

2.5.3.1 Standard-Protokoll

Eine typische PCR Reaktion enthält in 50 µl Reaktionsvolumen:

Substanz	Volumen (µl)	Konzentration
10x PCR-Puffer	5	
Sense Primer	1	50 pmol
Antisense Primer	1	50 pmol
PCR Nucleotide Mix	5	10 mM
DNA	2	1 µg
<i>Taq</i> DNA Polymerase	1,5	2,5 U
H ₂ O	ad 50 µl	

Die PCR wurde in einem Thermocycler durchgeführt. Ein typisches PCR-Programm umfasst:

Schritt	Temperatur	Zeit	Vorgang
1	94°C	5 min	Denaturierung der DNA
2	94°C	1 min	Denaturierung der DNA
3	57°C	1 min	Annealing der Primer
4	72°C	1,5 min	DNA-Synthese
5	-	-	Wiederholung Schritt 2-4 in 41 Zyklen
6	72°C	7 min	Abschließende Extension

Tab. 2: PCR-Programm Dysferlin.

Die erfolgreiche Amplifizierung des gewünschten DNA-Fragments wurde durch Agarose-Gelelektrophorese kontrolliert. Die PCR-Produkte wurden dann durch die anschließende Gelextraktion getrennt und aufgereinigt.

2.5.3.2 Abweichungen vom Standard-Protokoll

Um bei geringen Konzentrationen an Ausgangs-DNA ausreichende Mengen PCR-Produkt zu erreichen, bzw. um falsche Produkte auf ein Minimum zu beschränken, wurde in einigen Fällen eine Nested-PCR durchgeführt. Hierbei wird das PCR-Produkt in einer zweiten PCR eingesetzt, die verwendeten Primer liegen aber innerhalb des ersten PCR-Produktes. Unspezifische Produkte aus der ersten PCR bieten damit keine komplementären Sequenzen zur Anlagerung mehr und werden nicht mehr amplifiziert.

2.5.4 PCR-Primer

Die verwendeten Primer wurden auf den in der Genbank veröffentlichten Sequenzen (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi>) basierend und mit Hilfe des Programms Amplify 1.0 entworfen. Die Primer wurden vom Syntheselabor von Herrn Dr. G. Arnold im Genzentrum der LMU München synthetisiert.

2.5.4.1 Primer für PCR der Dysferlin cDNA

Mit den folgenden Primerpaaren wurden 15 überlappende PCRs der Dysferlin cDNA [Genbank-Zugangsnummer: 4503430] durchgeführt. Zur cDNA-Erststrangsynthese in der RT-PCR wurden die Antisense Primer 7, 13 und 15 verwendet.

Primername	Primersequenz	Fragmentlänge
1 S 1 AS	5' - ccctgggcgcacggggccta - 3' 5' - gagccccgggcctccgcttga - 3'	580
2 S 2 AS	5' - cgactctgcctgacctggatga - 3' 5' - cagccactcctgagatag - 3'	536
3 S 3 AS	5' - ctctcgttctctcaggacagatg - 3' 5' - tcgcacatggagggaaacatggc - 3'	507
4 S 4 AS	5' - gctgtgcagcaagatcttggaga - 3' 5' - agtacttgcgcctcctaag - 3'	494
5 S 5 AS	5' - agaccaagctggtggagcacagt - 3' 5' - gcagcctgcgatgagctcatcg - 3'	479
6 S 6 AS	5' - ccagctgctgggattgctgacc - 3' 5' - tccacagagagcccaaaccac - 3'	563
7 S 7 AS	5' - gaaatatccgatggagaagggtgcc - 3' 5' - tcgacagcccggttgaggctctgt - 3'	516
8 S 8 AS	5' - ctacatgagtgacaactaca - 3' 5' - cccatagtccaatatgcaggaa - 3'	550
9 S 9 AS	5' - cgtgatggatgacaagagtgaag - 3' 5' - ctctgcacctcaaaaccaggaat - 3'	529
10 S 10 AS	5' - ctctttgagctcatccagaga - 3' 5' - acgtctcccaggactgagtag - 3'	552
11 S 11 AS	5' - tcctgttgaccctactcgg - 3' 5' - ctactgatttctccta - 3'	556
12 S 12 AS	5' - ctacattgccgagcatttgg - 3' 5' - gccctgctgctgaagcacatgc - 3'	533
13 S 13 AS	5' - aggctggcaggatcccaaacc - 3' 5' - tcgaaggggaaaatgaacc - 3'	427
14 S 14 AS	5' - ggatgattggcttgaaga - 3' 5' - caagctagggtcatgttggg - 3'	521
15 S 15 AS	5' - gatttagcagagagtgagcat - 3' 5' - aatcaggcctaggaggctggag - 3'	383

Tab. 3: Primer für Dysferlin cDNA.

2.5.4.2 Primer für PCR der Dysferlin gDNA

Mit den folgenden Primerpaaren wurden fragliche Mutationen bei den Patienten und wenn möglich bei deren Verwandten auf genomischer Basis überprüft. Die Primer wurden mit Hilfe der veröffentlichten Dysferlin cDNA Sequenz [Genbank-Zugangsnummer: 4503430], der bisher bekannten gDNA Sequenz [Genbank-Zugangsnummer: 9211397] sowie den von Aoki beschriebenen Exon-Intron-Grenzen entworfen (Aoki et al. 2001).

Primername	Primersequenz	Fragmentlänge	Exon
S 4 IE AS 4 IE	5' - ctctctcaggttctctgggg - 3' 5' - cctgtgggctgcttcttggtg - 3'	116	4
S 5 IE AS 5 IE	5' - cctcgcgtgctcaggtgtccta - 3' 5' - aggtcaggcagagtcgggga - 3'	100	5
S 7 IE AS 7 IE	5' - cagctgccgggggtgaacatcaa - 3' 5' - ctattgaagagtgggctgtt - 3'	104	7
S 9 IE AS 9 IE	5' - acgtgcctgcttctgactgagatt - 3' 5' - taccgggaactccccgaggagagcat - 3'	427	9
S 11 IE AS 11 IE	5' - tctctagggcacgcctatctc - 3' 5' - gccagcacacaaaggctgtg - 3'	107	11
S 17 E AS 17 E	5' - gttcgggtctggtttcaactg - 3' 5' - aagtcagggactacctttgt - 3'	480	17
S 20 E AS 20 E	5' - ccggggcctgccagacgtat - 3' 5' - ggaccagggcctttgagtagact - 3'	385	20
S 21 IE AS 21 IE	5' - agcgctcagggcccgtctctcca - 3' 5' - tgcataggcatgtgcagcttg - 3'	193	21
S 24 E AS 24 E	5' - cctctgttcagccccagaa - 3' 5' - gcctaagaactaagataggtc - 3'	275	24
S 27 AS 27	5' - gggtgaggctgacatacgca - 3' 5' - gatgtgagcagggaggcagaaaag - 3'	468	27
S 29 E AS 29 E	5' - gctgcaaattaggaccga - 3' 5' - ctgtgagcacctccagtgagtc - 3'	413	29
S 30 E AS 30 E	5' - gcagaaagcccctctctctaggt - 3' 5' - cccacaggtactgacgccaggat - 3'	497	30
S 30 IE AS 30 IE	5' - cccttcttctgtgcagcacaggc - 3' 5' - gccaaaaagagaggcgtactccc - 3'	70	30
S 37 E AS 37 E	5' - ctccaccttctctcattcta - 3' 5' - ctggtactctcatgttccg - 3'	299	37
S 43 E AS 43 E	5' - cagccaaacatatcaacaa - 3' 5' - tgagggtcttagaaagttac - 3'	236	43
S 44 IE AS 44 IE	5' - gaagtgtttgtctcctctc - 3' 5' - actagactgtgggttatcctgt - 3'	177	44
S 45 E AS 45 E	5' - tgtgggtggtgggcctgtaag - 3' 5' - ggtgtgtgtcagagaagca - 3'	355	45
S 52 E AS 52 E	5' - ggctacaggctggcagtgatcg - 3' 5' - tggaagaagctccccatgc - 3'	289	52

Tab. 4: Primer für Dysferlin gDNA.

2.6 Aufreinigung der PCR-Produkte in der Agarose-Gelelektrophorese

2.6.1 Material

Agarose Sea Plaque		FMC Bioproducts, Rockland, USA
Ethidiumbromid		Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
H ₂ O _{deion}		Genzentrum, München, BRD
TAE-Laufpuffer 10x (pH 8,5):	Tris-HCL Na ₂ EDTA Essigsäure	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Ladepuffer:	Saccharose (4 g) Bromphenolblau TE-Puffer (6 ml)	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
DNA Längenstandard: GeneRuler 100bp DNA Ladder		MBI Fermentas, St.Leon-Rot

2.6.2 Auftrennung und Darstellung der PCR-Produkte im Agarosegel

Zur qualitativen Kontrolle der RNA- und DNA-Extraktion, bzw. vor dem Einsatz der PCR-Produkte in der Sequenzanalyse wurde die Qualität der Produkte durch Agarose-Gelelektrophorese in einer horizontalen Gelelektrophoreseapparatur überprüft. Dabei wandern unterschiedliche DNA-Fragmente entsprechend ihrer Größe und Ladung im elektrischen Feld und können so aufgetrennt werden. Je nach Länge der zu trennenden Fragmente wurde ein 0,8 bis 2% Agarosegel hergestellt. Entsprechend der Größe der verwendeten Gelkammer wurde Agarose in einen Erlenmeyerkolben eingewogen und mit TAE-Puffer aufgefüllt, so dass sich eine Lösung der gewünschten Konzentration ergab. Diese wurde in einer Mikrowelle so lange erhitzt, bis sich die Agarose schlierenfrei auflöste. Anschließend wurde die auf 50°C abgekühlte Agarose-Lösung mit 0,01 Vol. Ethidiumbromid versetzt und blasenfrei in eine mit Taschenschablone versehene Gelkammer gegossen. Nach Aushärten des Gels wurde die Schablone entfernt, die Kammer in die Elektrophoreseapparatur eingesetzt und mit 1xTAE-Puffer überschichtet.

Die Proben wurden mit 1/10 Volumen Ladepuffer versetzt und in die Taschen eingebracht. Eine Tasche wurde mit einer Negativkontrolle versehen (PCR-Ansatz ohne DNA), in eine weitere Tasche wurde eine 100 bp Leiter eingebracht. Die Elektrophorese erfolgte bei 6-8V/cm, d.h. 80V für kleine und 120V für große Gele. Sie wurde beendet, wenn die Farbbande des Ladepuffers 2/3 der Laufstrecke zurückgelegt hatte.

Der im Gel entstandene DNA-EtBr-Komplex wurde mit UV-Licht angeregt und erschien als leuchtende Bande. Die Ergebnisse wurden photodokumentiert.

2.7 Gelextraktion

2.7.1 Material

QIAquick Gel Extraction Kit
Isopropanol

Qiagen GmbH, Hilden, BRD
Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, BRD

2.7.2 Vorgehen

Um im Gel nachgewiesene PCR-Produkte für die Weiterbearbeitung zurück zu gewinnen, wurde die DNA aus dem Gel eluiert. Dazu wurde die DNA-Bande unter UV-Lichtkontrolle mit einem Skalpell aus dem Gel herausgeschnitten und in ein Reaktionsgefäß transferiert.

Die DNA wurde dann mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction Kit nach Angaben des Herstellers extrahiert. Die gelöste DNA wurde bei -20°C gelagert.

2.8 Restriktionsverdau

Soweit möglich erfolgte die Überprüfung von Mutationen und die Durchführung von Normalkontrollen mittels Restriktionsverdau. Restriktionsenzyme fügen DNA-Molekülen sequenzspezifisch Doppelstrangbrüche zu. Dazu wurden hier 1-10 μg DNA in einem Standardansatz mit 2 μl 10x Puffer und 1 μl Restriktionsenzym (10-20 Units) versetzt und mit destilliertem Wasser auf 20 μl Endvolumen aufgefüllt. Der Verdau erfolgte für 3 h bei der für das jeweilige Enzym optimalen Reaktionstemperatur. Die Ergebnisse wurden je nach Fragmentlänge in einem 2-4% Agarosegel sichtbar gemacht. Enzyme und Puffer wurden von den Firmen MBI Fermentas (St. Leon-Rot) und New England Biolabs GmbH (Frankfurt am Main) bezogen.

2.9 Fluoreszenzgestützte Sequenzanalyse

Die zu untersuchenden PCR-Produkte wurden in beide Richtungen sequenziert. Die Sequenzierung erfolgte im Labor von Herrn Dr. H. Blum am Genzentrum der LMU München und teilweise durch die Firma Medigenomix in Martinsried, München. Verwendet wurden DNA-Sequenziergeräte der Firma Applied Biosystems (Modelle Prism XL 96 bzw. 377) und fluoreszenzmarkierte Didesoxy-Terminatoren.

Die Sequenzen wurden anschließend auf potentielle Mutationen untersucht. Der Vergleich mit der entsprechenden Wildtypsequenz erfolgte computergestützt mit dem Programm MacDNAsis Pro 1.0 (Hitachi Software Engineering) oder online über den Server des National Center for Biotechnology Information (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/). Die Mutationen wurden durch Sequenzierung des jeweiligen Exons von genomischer DNA der Patienten und ihrer Verwandten verifiziert.

2.10 Andere Untersuchungen

Klinische Untersuchung, Histologie, Elektronenmikroskopie, Immunhistologie und Immunoblot sowie in einigen Fällen molekulargenetische Untersuchungen anderer Gene wurden am Friedrich-Baur-Institut der LMU München durchgeführt.

Die Haplotypen-Analyse erfolgte im Labor von Frau Prof. Dr. A. Hübner an der Klinik und Poliklinik für Kinder- und Jugendmedizin der TU Dresden.

D Ergebnisse

Es wurden insgesamt 17 Patienten mit dem Verdacht auf eine Gliedergürtel-Muskeldystrophie oder distale Muskeldystrophie aus unterschiedlichen Familien untersucht. Das Vorliegen einer Duchenne- oder Becker-Muskeldystrophie sowie einer Sarkoglykanopathie war bereits durch die durchgeführte Proteindiagnostik ausgeschlossen worden. Bei positivem Befund in der Mutationsanalyse des Dysferlin-Gens wurde dieser an 100 Normalkontrollen und, wenn möglich, an dem genetischen Material der Angehörigen überprüft.

Anhand der genetischen Untersuchung ließen sich die Patienten in eine Gruppe mit verdächtigen Befunden in der Mutationsanalyse des Dysferlin-Gens und eine Gruppe mit unauffälligem Befund einteilen.

1 Patienten mit Abweichungen von der Normalsequenz in der Mutationsanalyse des Dysferlin-Gens (Patienten 1-7)

Bei sieben Patienten (1-7) ergab die Mutationsanalyse eine Abweichung von der Normalsequenz, bei den anderen Patienten (8-17) nicht. Bei den Patienten 1-5 und ihren betroffenen Geschwistern wurden pathogene Mutationen nachgewiesen.

Bei Patientin 6 ergaben die klinischen Untersuchungen und die Befunde der Molekularanalyse keine eindeutigen Ergebnisse, bei Patient 7 konnte eine Dysferlinopathie weitgehend ausgeschlossen werden.

1.1 Klinische Daten der Patienten 1-7

Eine Übersicht der klinischen Daten und Untersuchungsbefunde findet sich in Tabelle 5. Die Patienten 1-3 und 6-7 sind deutscher, Patient 4 türkischer und Patientin 5 österreichischer Abstammung. Konsanguinität liegt nur in der Familie von Patient 4 vor, seine Eltern sind Cousin und Cousine ersten Grades.

Patienten-angaben	1	2	3	4	5	6	7
Krankheitsbeginn	Alter 20	Alter 14	Alter 23	Alter 21	Alter 35	Alter 53	Alter 40
Untersuchung	Geschlecht w	Geschlecht w	Geschlecht w	Geschlecht m	Geschlecht w	Geschlecht w	Geschlecht m
	Alter b. Untersuchung Nein	Alter b. Untersuchung Nein	Alter b. Untersuchung Nein	Alter b. Untersuchung Ja	Alter b. Untersuchung Nein	Alter b. Untersuchung Nein	Alter b. Untersuchung Nein
	Konsanguinität 2	Konsanguinität 2	Konsanguinität 1	Konsanguinität 2	Konsanguinität 0	Konsanguinität 0	Konsanguinität 0
	betr. Geschwister 20	betr. Geschwister 14	betr. Geschwister 20	betr. Geschwister 18	betr. Geschwister 24	betr. Geschwister 40	betr. Geschwister 37
	Verteilung distale UE, va. posterior	Verteilung proximale UE	Verteilung proximale UE	Verteilung distale UE, va. posterior	Verteilung distale und proximale UE	Verteilung proximale UE	Verteilung proximale UE
Erstsymptome	ZSG erschwert	TST erschwert	TST erschwert	ZSG erschwert	ZSG erschwert	HyperCKämie	Kraft vermindert
MRC-Index							
	Oberarm 4-5	Oberarm 5	Oberarm 4-5	Oberarm 5	Oberarm 4-5	Oberarm 5	Oberarm 5
	Unterarm 5	Unterarm 5	Unterarm 4-5	Unterarm 5	Unterarm 4-5	Unterarm 5	Unterarm 5
	Oberschenkel 3-4	Oberschenkel 4	Oberschenkel 3	Oberschenkel 4-5	Oberschenkel 4	Oberschenkel 3-4	Oberschenkel 4-5
	Unterschenkel posterior 3-4	Unterschenkel posterior 3	Unterschenkel posterior 3-4	Unterschenkel posterior 3-4	Unterschenkel posterior 2-3	Unterschenkel posterior 5	Unterschenkel posterior 5
	Unterschenkel anterior 4-5	Unterschenkel anterior 4	Unterschenkel anterior 3-4	Unterschenkel anterior 4	Unterschenkel anterior 3	Unterschenkel anterior 5	Unterschenkel anterior 5
Andere							
	ZST ↓↓	ZST ↓	ZST ↓↓↓	ZST ↓↓↓	ZST ↓↓↓	ZST ↑	ZST ↑
	FG ↓	FG ↓	FG ↓↓↓	FG ↓↓↓	FG ↓↓↓	FG ↑	FG ↑
	CK (U/l) >3000	CK (U/l) >4000	CK (U/l) >7000	CK (U/l) >7000	CK (U/l) >5000	CK (U/l) >1000	CK (U/l) >2000
	EMG myopathisch	EMG myopathisch	EMG myopathisch	EMG myopathisch	EMG myopathisch	EMG myopathisch	EMG myopathisch
Biopsie	Muskel M. vastus med. myopathisch	Muskel M. vastus lat. myopathisch	Muskel M. quadriceps fem. myopathisch	Muskel M. tibialis ant. myopathisch	Muskel M. biceps brachii myopathisch	Muskel M. rectus fem. myopathisch	Muskel M. vastus lat. myopathisch, rimmed vacuoles
	Entzündung nein	Entzündung ja	Entzündung nein	Entzündung nein	Entzündung nein	Entzündung nein	Entzündung ja
Proteindiagnostik							
	Immunoblot Dysferlin ↓↓↓	Immunoblot Dysferlin ↓↓↓	Immunoblot Dysferlin ↓↓↓	Immunoblot Dysferlin ↓↓↓	Immunoblot Dysferlin ↓↓↓	Immunoblot Dysferlin ↓↓	Immunoblot Dysferlin ↑
	Caveolin-3 ↓	Caveolin-3 -	Caveolin-3 ↓↓	Caveolin-3 k. M.	Caveolin-3 ↑	Caveolin-3 -	Caveolin-3 -
	Calpain-3 ↓	Calpain-3 ↓↓	Calpain-3 ↑	Calpain-3 k. M.	Calpain-3 ↑	Calpain-3 ↑	Calpain-3 ↓↓
	Immunhistologie Dysferlin ↓↓↓	Immunhistologie Dysferlin ↓↓↓	Immunhistologie Dysferlin ↓↓↓	Immunhistologie Dysferlin ↓↓↓	Immunhistologie Dysferlin ↓↓↓	Immunhistologie Dysferlin ↓↓↓	Immunhistologie Dysferlin ↓
	Caveolin-3 ↓	Caveolin-3 ↑	Caveolin-3 ↓↓	Caveolin-3 ↓	Caveolin-3 ↑	Caveolin-3 -	Caveolin-3 ↓↓
Erstdiagnose	distale Myopathie MM	Distalmyopathie LGMD2B	unklare MD LGMD2B	unklare MD MM	unklare LGMD LGMD2B	LGMD unklare MD	BMD unklare MD
Enddiagnose							

Tab. 5: Untersuchungsbefunde der Patienten mit verdächtigem Befund in der Mutationsanalyse des Dysferlin-Gens

Abkürzungen (Tab 5 und 8) - ad.: autosomal dominant; AMPD: Myoadenylate Deaminase; betr.: betroffene; BMD: Muskeldystrophie Typ Becker; CK: Creatinkinase; EMG: Elektromyographie; FG: Fersengang; GNE: UDP-N-Acetylglucosamin-2-Epimerase/N-Acetylmannosamin Kinase; k.M.: kein Material; LGMD: Gliedergürtel-Muskeldystrophie; m: männlich; MM: Miyoshi Myopathie; MRC: Medical Research Council; OE: Obere Extremität; TST: Treppensteigen; UE: Untere Extremität; va.: vor allem; V.a.: Verdacht auf; w: weiblich; ZSG: Zehenspitzengang; ZST: Zehenspitzenstand; ↓ - normal; ↓↓↓: total; ↓↓: deutlich; ↓: gering reduziert; -: keine Angaben verfügbar

Bei den Patienten 1-5 lag der Krankheitsbeginn um das Ende des 2. Lebensjahrzehnts, histologische und elektromyographische Befunde zeigten typische myopathische Muster. Bei Patient 2 wurden außerdem entzündliche Veränderungen mit CD4+-Zellen und Makrophagen perivaskulär, im Bereich von Muskelzell-Nekrosen und zwischen gesunden Muskelzellen nachgewiesen. Die CK war in allen Fällen weit über das Zehnfache der Norm (CK-Normwert < 155 U/l für Frauen, < 180 U/l für Männer) erhöht. Unterschiede ergaben sich in der Verteilung der Muskelschwäche:

Die Patientin 1 zeigte zunächst eine Schwäche und Atrophie der posterioren Kompartimente der Unterschenkel mit Problemen beim Zehenspitzenang und rascher Ermüdung beim Laufen. Es wurde kernspintomographisch eine Atrophie des M. gastrocnemicus nachgewiesen. Bei langsamer Progredienz griff die Schwäche auf die proximale Beinmuskulatur über. Die drei Jahre ältere Schwester der Patientin zeigte eine fast identische Klinik mit ähnlichem Verlauf und Verteilungsmuster. Bei dem sieben Jahre jüngeren Bruder liegen, bis auf eine CK-Erhöhung von > 2000 U/l, bislang keine Symptome vor.

Die Patientin 2 zeigte bei Krankheitsbeginn eine Schwäche der Oberschenkelmuskulatur. Sie berichtete über rasche Ermüdbarkeit der Muskulatur und Probleme beim Treppensteigen. Im Verlauf der Krankheit machte sich auch eine beginnende Schwäche der Unterschenkelmuskulatur bemerkbar. Die jüngeren Geschwister von Patientin 2 konnten nicht untersucht werden.

Bei Patientin 3 war das Erstsymptom ebenfalls eine Schwäche der Oberschenkelmuskulatur, mit entsprechenden Symptomen wie erschwertem Treppensteigen. Neben einer Ausweitung der Schwäche auf die Unterschenkelmuskulatur mit Wadenatrophie bei langsamer Progredienz zeigte sich etwa 5 Jahre nach Krankheitsbeginn auch eine Beteiligung vor allem der proximalen Armmuskulatur. Die ebenfalls betroffene drei Jahre ältere Schwester von Patientin 3 zeigte bei ähnlich hohen CK-Werten eine geringere Symptomatik mit nur leichter Schwäche der Oberschenkelmuskulatur; die Mobilität ist bislang nicht eingeschränkt.

Die Klinik von Patient 4 ist der von Patientin 1 in Verlauf und Verteilung mit Schwäche und Atrophie der posterioren Unterschenkelmuskulatur und folgendem Übergriff auf die Oberschenkelmuskulatur sehr ähnlich, auch hier wurde kernspintomographisch eine Atrophie des M. gastrocnemicus nachgewiesen. Er hat einen fünf Jahre jüngeren gesunden Bruder, seine neun Jahre jüngeren Zwillingsschwestern zeigen eine deutlich erhöhte CK, aber bisher noch keine muskuläre Schwäche.

Bei Patientin 5 waren zum Untersuchungszeitpunkt sowohl die Oberschenkelmuskulatur als auch die Unterschenkel im Sinne einer Wadenatrophie betroffen (Abbildung 3). Erstsymptom bei Krankheitsbeginn war eine rasche Ermüdbarkeit der Oberschenkelmuskulatur. Wie bei Patientin 3 kam es nach etwa fünf Jahren zu einer Beteiligung der proximalen Armmuskulatur.



Abb. 3: Atrophie der anterioren und posterioren Unterschenkelmuskulatur von Patientin 5.

Der Erkrankungsbeginn bei Patientin 6 lag im 40. Lebensjahr. Von vornherein betroffen war die proximale Oberschenkelmuskulatur. Bei zunehmender Progredienz war das Treppensteigen erschwert und schnelles Laufen unmöglich. Die Muskulatur der Unterschenkel ist bisher nicht betroffen. EMG und Histologie zeigten ein myopathisches Bild. Auch Patient 7 erkrankte mit 37 Jahren erst im höheren Lebensalter. Er zeigte klinisch lediglich eine deutliche Atrophie bei nur leichter Schwäche der distalen Oberschenkelmuskulatur ohne weitere Ausfälle. Im EMG und in der Biopsie zeigte der M. vastus lateralis myopathische Veränderung, wobei lichtmikroskopisch Einschlusskörperchen (rimmed vacuoles) nachgewiesen werden konnten. Weitere Symptome, die auf eine Einschlusskörperchenmyopathie oder –myositis hindeuten, liegen bei dem Patienten bisher nicht vor. Der klinische Verdacht auf eine Muskeldystrophie vom Typ Becker-Kiener konnte in der Proteindiagnostik widerlegt werden.

1.2 Proteindiagnostik und Haplotypenanalyse

In der Proteindiagnostik ergab sich für die Patienten 1-5 ein totaler Verlust von Dysferlin in der Immunhistologie (siehe Abbildung 4) und im Immunoblot. Auffällig war weiterhin die Abschwächung des Calpain-3 im Immunoblot bei Patient 1 und 2. Ebenso war dies bei der Proteindiagnostik für Caveolin-3 der Fall, das sich bei Patient 1, 3 und 4 gering bis deutlich reduziert zeigte.

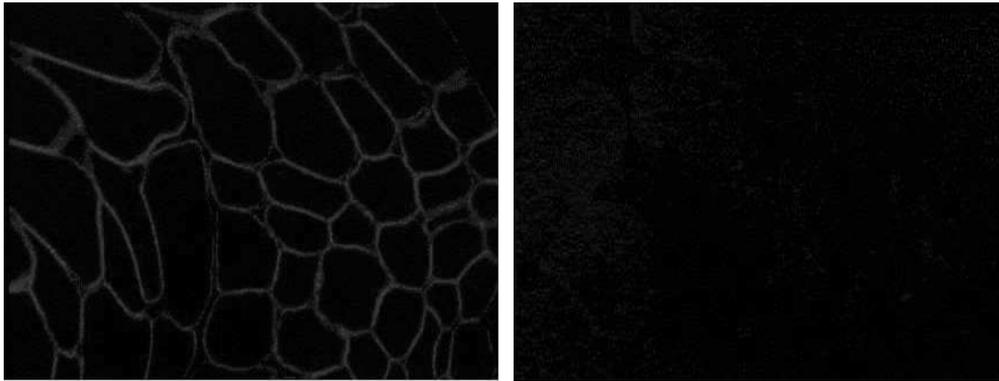


Abb. 4: Dysferlin-Immunhistologie: Links Normalbefund, rechts Immunhistologie von Patientin 5 mit fehlender Dysferlinfärbung

Mittels Haplotypenanalyse konnte der Genort für Calpain-3 bei Patient 1 ausgeschlossen werden, für Patient 2 wurde keine Haplotypenanalyse durchgeführt. Der Genort für Caveolin-3 auf Chromosom 3p25 konnte für Patient 1, 3 und 4 ausgeschlossen werden, auch wurden molekulargenetisch bei Patientin 3 keine Mutationen im Caveolin-3-Gen gefunden. Für den Genort für Dysferlin auf Chromosom 2p13 war bei Patient 1, 3, und 4 eine Kopplung möglich.

Bei Patientin 6 zeigte sich in der Proteindiagnostik eine deutliche Abschwächung des Dysferlins bei normalem Calpain-3. Eine Haplotypenanalyse konnte nicht durchgeführt werden, es ergaben sich aber familienanamnestisch Hinweise auf einen möglichen autosomal-dominanten Erbgang. In der Proteindiagnostik zeigte Patient 7 eine leichte Verringerung von Caveolin-3 und Calpain-3. Dysferlin wies in der Immunhistologie eine geringe Abschwächung, im Blot aber einen Normalbefund mit deutlicher Bande auf. Die für diesen Patienten durchgeführten molekulargenetischen Untersuchungen für Calpain-3 und Caveolin-3 erbrachten keine Mutationen in diesen Genen.

Die Untersuchungsergebnisse sind in Tabelle 6 zusammengefasst.

Patient	Proteindiagnostik			Haplotypenanalyse	Mutationsanalyse
	Protein	Immunoblot	IHL		
1	Dysferlin Caveolin-3 Calpain-3	↓ ↓ ↓ ↓ ↓	↓ ↓ ↓ ↓ -	Kopplung möglich ausgeschlossen ausgeschlossen	Mutationen gefunden - -
2	Dysferlin Caveolin-3 Calpain-3	↓ ↓ ↓ - ↓ ↓	↓ ↓ ↓ ↑ -	- - -	Mutationen gefunden - -
3	Dysferlin Caveolin-3 Calpain-3	↓ ↓ ↓ ↓ ↓ ↑	↓ ↓ ↓ ↓ ↓ -	Kopplung möglich ausgeschlossen ausgeschlossen	Mutationen gefunden keine Mutationen gefunden -
4	Dysferlin Caveolin-3 Calpain-3	↓ ↓ ↓ k. M. k. M.	↓ ↓ ↓ ↓ -	Kopplung möglich ausgeschlossen ausgeschlossen	Mutationen gefunden - -
5	Dysferlin Caveolin-3 Calpain-3	↓ ↓ ↓ ↑ ↑	↓ ↓ ↓ ↑ -	- - -	Mutationen gefunden - -
6	Dysferlin Caveolin-3 Calpain-3	↓ ↓ - ↑	↓ ↓ ↓ - -	- - -	nur 1 heterozygote Mutation - -
7	Dysferlin Caveolin-3 Calpain-3	↑ n. d. ↓ ↓	↓ ↓ ↓ -	- - -	nur Polymorphismen keine Mutationen gefunden keine Mutationen gefunden

Tab. 6: Übersicht der Protein-, Haplotypen- und Mutationsdiagnostik

1.3 Molekulargenetische Befunde der Dysferlin-Gen-Diagnostik

Durch PCR und Mutationsanalyse wurden bei den Patienten 1-7 folgende Befunde erhoben und durch direkten Sequenzvergleich, Restriktionsverdau und Normalkontrollen folgende exonische Mutationen nachgewiesen (Tabelle 7).

Bei Patientin 1 und ihren Geschwistern wurden jeweils heterozygot eine Punktmutation und eine Frameshift-Mutation nachgewiesen. Ersterer liegt ein Nukleotidtausch an Position 5129 in Exon 43 von Cytosin zu Thymin zugrunde. Das für Arginin codierende Codon 1586 wird so zu einem Stopp-Codon. Diese Mutation wurde bereits beschrieben (Aoki et al. 2001), die Befunde des Restriktionsverdaus und der Sequenzanalyse sind in Abbildung 5 dargestellt.

Die von der Mutter vererbte Frameshift-Mutation resultiert aus der Deletion von Thymin an Position 5393 in Exon 45.

Pat.	Exon	Nucleotid	Konsequenz	Mutation b. Verwandten			Wertung	Literatur
				Vater	Mutter	Geschwister		
1	43 45	5129 C>T 5393 del T	Arg 1586 Stopp Frameshift	+ -	- +	+ +	pathogen pathogen	Aoki 2001
2	11 27 30	1335 T>G 3248 C>T 3570 ins 6	Leu 321 Arg Arg 959 Trp Einfügen von 2 AS	+ - -	- + +	k. M.	pathogen pathogen fragl. Signifikanz	Cagliani 2003 Cagliani 2003
3	9 30	1237 ins A 3570 ins 6	Frameshift Einfügen von 2 AS	+ -	- +	+ +	pathogen fragl. Signifikanz	Cagliani 2003
4	21	2347 ins A	Frameshift (homozygot)	k. M.	+	++	pathogen	
5	4 44	638 C>T 5245 del G	Arg 89 Stopp Frameshift	k. M.	k. M.	keine	pathogen pathogen	Bashir 1998
6	7	1130 C>T	Arg 253 Trp (heterozygot)	k. M.	k. M.	keine	fragl. Signifikanz	
7	24 29 37	2873 A>G 3438 G>A 4365 G>T	Ile 834 Val Arg 1022 Gln Arg 1331 Leu	k. M.	k. M.	keine	Polymorphismus Polymorphismus Polymorphismus	Cagliani 2003 Cagliani 2003

Tab. 7: Ergebnisse der molekularen Diagnostik des Dysferlin-Gens [Genbank-Zugangsnummer: 4503430]

Patientin 2 zeigte in Exon 11 und 27 jeweils eine Punktmutation. Bei Nukleotidposition 1335 ist Thymin durch Guanin, bei Position 3248 Cytosin durch Thymin ersetzt, was in einen Austausch von Leucin durch Arginin an Codon 321 und von Arginin durch Tryptophan an Codon 959 resultiert. Letztere Mutation wurde bereits beschrieben (Cagliani et al. 2003). Neben diesen beiden Mutationen fand sich noch eine Insertion von 6 Basenpaaren bei Nukleotidposition 3570 in Exon 30. Es kommt zum Einfügen von zwei zusätzlichen Aminosäuren (Alanin und Glutamat) bei ansonsten erhaltenem Leseraster.

Die gleiche Insertion fand sich, vererbt durch die Mutter, bei Patientin 3 und ihrer Schwester. Es bestehen keine verwandtschaftlichen Beziehungen zwischen den Familien von Patientin 2 und 3. Die Insertion lag in den durchgeführten 100 Normalkontrollen in zwei Fällen heterozygot vor. In einer Veröffentlichung wurde sie ohne nähere Angaben als Polymorphismus bezeichnet (Cagliani et al. 2003). Bei der zweiten Mutation der Patientin und ihrer Schwester handelt es sich um eine väterlich vererbte Frameshift-Mutation durch eine Adenin-Insertion bei Nukleotidposition 1237 in Exon 9.

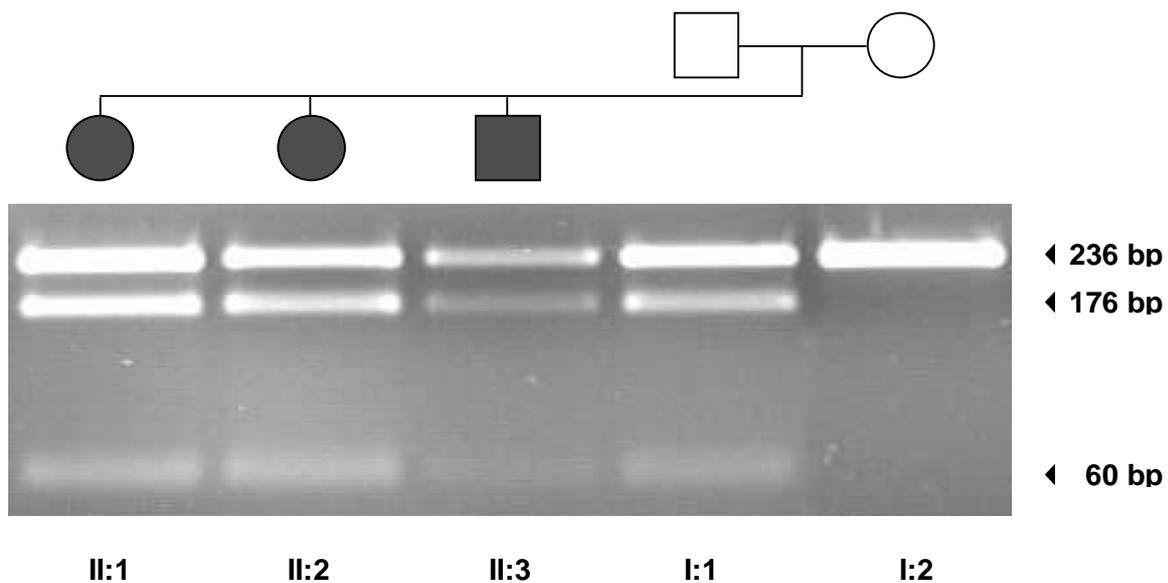


Abb. 5.1: Restriktionsverdau für die Mutation 5129 C>T in Exon 43 in Familie 1 auf einem 4% Agarosegel. Die PCR mit den Primern S 43 E und AS 43 E ergibt ein 236 bp langes Fragment. Die Mutation verursacht eine Schnittstelle für das Restriktionsenzym Dde I (New England Biolabs). Das Wildtypallel bleibt unverdaut, während das mutierte Allel zwei Fragmente ergibt (176 bp und 60 bp). Der Vater (I:1) ist heterozygot für diese Mutation und hat sie im Sinne eines autosomal-rezessiven Erbgangs an seine drei Kinder weitervererbt (II:1 Patientin 1, II:2 Schwester, II:3 Bruder).

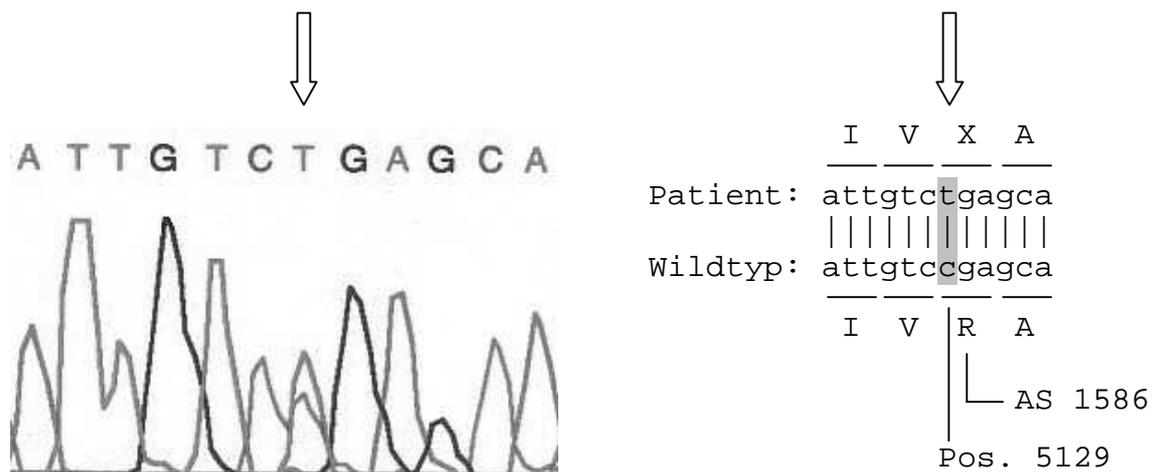


Abb. 5.2: Ausschnittsweise Darstellung der Sequenz von Exon 43 der Patientin 1 in Sense Richtung. Bei Position 5129 (Pfeil) zeigt sich die Punktmutation als Doppelbande. Auf dem väterlichen Allel befindet sich Thymin, darunter das nichtmutierte Cytosin des mütterlichen Allels. Daneben korrespondierend der Vergleich zwischen Wildtyp und Patientensequenz. (Abkürzungen: AS - Aminosäure, I - Isoleucin, V - Valin, R - Arginin, A - Alanin, X - Stopp-Codon)

Bei Patient 4 fand sich bei Konsanguinität in der Familie eine noch nicht beschriebene, homozygot vorliegende Frameshift-Mutation, eine Adenin-Insertion bei Nukleotidposition 2347 in Exon 21. Die Zwillingsschwestern tragen dieselbe Mutation in homozygoten Zustand, der jüngere Bruder ist homozygot gesund. Während vom Vater kein Material zur Untersuchung zur Verfügung stand, konnte die Insertion bei der Mutter heterozygot nachgewiesen werden.

Die Mutationsanalyse bei Patientin 5 ergab einen Nukleotidtausch von Cytosin zu Thymin bei Position 638 in Exon 4. Das für Arginin codierende Codon wird so zu einem Stopp-Codon. Die zweite, bereits als pathogen beschriebene Mutation (Bashir et al. 1998, Aoki et al. 2001) in Exon 44 resultiert durch eine Guanin-Deletion an Nukleotidposition 5245 in einer Leserasterverschiebung. Genetisches Material der Verwandten stand nicht zur Verfügung.

Patientin 6 zeigte heterozygot eine Punktmutation in Exon 7, bei der an Nukleotidposition 1130 Cytosin durch Thymin ersetzt wird. Daraus resultiert ein Austausch von Arginin durch Tryptophan an Codon 253. Diese Mutation wurde in 100 Normalkontrollen nicht gefunden, jedoch konnte in der Mutationsanalyse keine weitere, korrespondierende heterozygote Mutation festgestellt werden.

Bei den Befunden von Patient 7 handelte es sich jeweils um einen Basen-Austausch in Exon 24, 29 und 37 an Position 2873 (Guanin statt Adenin), 3438 (Adenin statt Guanin) und 4365 (Thymin statt Guanin). Als Folge dessen kommt es zum Austausch der Aminosäuren Isoleucin durch Valin an Aminosäure-Position 834, Arginin durch Glutamin an Position 1022 sowie Arginin durch Leucin an Position 1331. Bei den durchgeführten Normalkontrollen konnten diese Veränderungen jedoch als Polymorphismen identifiziert werden, wobei die beiden letzteren auch in der Literatur bereits als solche beschrieben wurden (Cagliani et al. 2003).

1.4 Zusammenfassung der Diagnostik

Nach Betrachtung aller Ergebnisse wurde bei den Patienten 1-5 die Diagnose Dysferlinopathie gestellt, für die Patienten 1 und 4 entsprechend des klinischen Befundes mit dem Phänotyp MM, für die Patienten 2, 3 und 5 mit dem Phänotyp LGMD2B.

Fraglich bleibt dabei die Signifikanz der Mutation in Exon 30 (Insertion von 6 Basenpaaren) bei eindeutiger Klinik, Proteindiagnostik und Haplotypenanalyse bei Patientin 3.

Unklar bleibt zunächst auch die Diagnose bei den Patienten 6 und 7.

Patientin 6 zeigte zwar bei verhältnismäßig spätem Krankheitsbeginn passende klinische Befunde und Proteindiagnostik, doch konnte keine zweite heterozygote Dysferlin-Mutation gefunden werden. Darüber hinaus gibt es familienanamnestisch Hinweise auf einen autosomal-dominanten Erbgang der Erkrankung, so dass hier bis zur weiteren Abklärung keine eindeutige Diagnose gestellt werden konnte.

Eindeutiger ist das Ergebnis bei Patient 7. Bei für die Erkrankung untypischer Verteilung der Muskelschwäche, positivem Dysferlin-Blot und als Polymorphismen identifizierten Befunden in der Genanalyse konnte die Dysferlinopathie weitgehend ausgeschlossen werden.

2 Patienten ohne Abweichungen von der Normalsequenz in der Mutationsanalyse des Dysferlin-Gens (Patienten 8-17)

Bei den folgenden Patienten wurde bei Verdacht, bzw. im Rahmen der Differentialdiagnostik, eine Mutationsanalyse des Dysferlin-Gens veranlasst. Grundlage waren auch hier die Befunde der Klinik oder der Proteindiagnostik.

Die betreffenden Daten sind in Tabelle 8 zusammengefasst. Bei keinem der Patienten konnten Mutationen des Dysferlin-Gens im von der PCR erfassten Bereich gefunden werden.

Bei vier Patienten konnten in der weiteren Diagnostik Mutationen in anderen Genen identifiziert werden. Bei Patient 8 wurde histologisch das Auftreten sog. 'ragged red fibers' festgestellt, die bei mitochondrialen Erkrankungen auftreten können, für eine Dysferlinopathie jedoch nicht typisch sind. Bei einer biochemischen Untersuchung der Atmungskettenenzyme wurde daraufhin ein Mangel der Myoadenylat-Desaminase (AMPD) festgestellt. Die genetische Untersuchung ergab eine für das AMPD-Gen bekannte, homozygot vorliegende Nonsense-Mutation mit Austausch von Cytosin durch Thymin an Nucleotidposition 34 (Morisaki et al. 1992).

Von der aus Osteuropa stammenden Patientin 9 waren keine ausführlichen klinischen Daten zu erhalten, es konnte jedoch am Friedrich-Baur-Institut eine homozygote Punktmutation des GNE-Gens identifiziert werden. Diese resultiert in einen Aminosäure-Austausch von Isoleucin durch Threonin an Position 587 in Exon 10 des Gens und klinisch in einer hereditären Einschlusskörperchenmyopathie (Eisenberg et al 2001).

Patienten-angaben	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
Patient										
Geschlecht	m	w	w	m	w	w	m	m	w	w
Alter b. U.	40	31	27	38	61	43	50	12	63	59
Konsanguinität	Nein	-	Nein	Nein	Nein	Nein	Nein	Nein	Nein	Nein
betr. Geschwister	0	-	0	0	0	0	0	0	0	1
Alter	24	-	10	28	47	22	49	12	59	32
Verteilung	proximale UE	distale UE, va. anterior	proximale UE	proximale UE	proximale UE	proximale UE und OE	distale UE	UE und OE rechts betont	proximale UE	proximale UE
Erstsymptome	TST erschwert	-	TST erschwert	TST erschwert	TST erschwert	TST erschwert	Muskelkrämpfe	Fußheberschwäche	TST erschwert	TST erschwert
MRC-Index										
Oberarm	4-5	-	3-4	3-4	4	2-3	5	4-5	3-4	3-4
Unterarm	5	-	4	4	5	3-4	5	4-5	5	5
Oberschenkel	3-4	-	3	3-4	3-4	2-3	5	3	2-3	2-3
Unterschenkel post.	3-4	-	5	4	3	3	5	3	5	3
Unterschenkel ant.	3-4	-	2	4	2	4	5	4	4	1
Andere										
ZST	↓-↓-↓	-	↑	↓-↓-↓	↓-↓-↓	↓-↓	↑	↓-↓-↓	↑	↓-↓-↓
FG	↓-↓-↓	-	↓-↓-↓	↓-↓-↓	↓-↓-↓	↓	↑	↓-↓-↓	↓-↓	↓-↓-↓
CK (U/l)	>3000	-	>6000	>1000	nicht erhöht	>1000	>200	>700	>200	>600
EMG	myopath.	-	myopath.	myopath.	myopath.	myopath.	myopath.	myopath.	myopath.	myopath.
Muskel	M. deltoideus	-	M. biceps br.	M. biceps br.	M. vastus lat.	M. tib. ant.	-	M. tib. ant.	M. rectus fem.	M. deltoideus
Histologie	myopath., ragged red fibers	-	myopath.	myopath.	myopath.	myopath.	myopath.	myopath., rimmed vacuoles	myopath.	myopath.
Entzündung	nein	-	nein	nein	nein	nein	nein	ja	nein	nein
Immunoblot										
Dysferlin	↓-↓-↓	-	↓-↓	↑	↑	↑	↓-↓	-	↓	↓-↓-↓
Caveolin-3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Calpain-3	↓	-	↑	↓-↓	↑	↑	↑	-	↓-↓	↓
Immunhistologie										
Dysferlin	↓-↓-↓	-	-	↓-↓	↓-↓-↓	↓-↓	↑	-	↓	↓-↓-↓
Caveolin-3	-	-	-	↑	-	↑	-	-	↑	-
Erstdiagnose	unklare LGMD	dist. Myopathie	V.a. LGMD2B	unklare LGMD	unklare LGMD	unklare LGMD	unklare LGMD	unklare MD	unklare LGMD	unklare LGMD
Enddiagnose	AMPD-Mutation	GENE-Mutation	LGMD2I	LGMD2A	unklare LGMD	unklare LGMD	unklare LGMD	V.a. ad. vakuoläre Myopathie	unklare LGMD	V.a. LGMD2B

Tab. 8: Untersuchungsbefunde der Patienten ohne Befund in der Mutationsanalyse des Dysferlin-Gens

Bei Patientin 10 konnte molekulargenetisch eine LGMD2I mit zugrunde liegendem FKRP-Mangel festgestellt werden. Bei der Patientin wurden zwei vorbeschriebene Mutationen heterozygot vorliegend bestätigt (Brockington et al. 2001a, Brockington et al. 2001b). An Aminosäureposition 114 des FKRP-Gens kommt es so zum Austausch von Alanin durch Glycin, an Position 276 von Leucin durch Isoleucin.

Bei Patient 11 wurde in der Immunhistologie eine verringerte Anfärbung für Dysferlin festgestellt, im Immunoblot war Dysferlin normal nachweisbar. Bei gleichzeitiger Abschwächung von Calpain-3 im Blot wurde eine heterozygote, für das Calpain-3-Gen vorbeschriebene Mutation identifiziert (de Paula et al. 2002). Es kommt hier an Aminosäureposition 82 zum Austausch von Prolin durch Leucin. Eine zweite heterozygote Mutation konnte bisher nicht identifiziert werden, in der Zusammenschau der Befunde wird bei dem Patienten jetzt eine Calpainopathie (LGMD2A) als Diagnose geführt.

Bei den Patienten 12 und 13 konnte bei deutlicher Abschwächung des Dysferlins in der Immunhistologie dieser Befund im Immunoblot nicht bestätigt werden. Da auch die Mutationsanalyse ohne Ergebnis blieb, wurde eine Dysferlinopathie für diese Patienten ausgeschlossen.

Eine für die Dysferlinopathie wenig typische Klinik zeigten die Patienten 14 und 15. Bei Patient 14 stehen seit dem 49. Lebensjahr intermittierende Verhärtungen vor allem der Wadenmuskulatur im Vordergrund. Außerdem kam es auch zu nicht schmerzhaften Zuckungen in der Muskulatur des Oberschenkels und der Oberarme. Eine muskuläre Schwäche war nicht erkennbar, die CK war erhöht und es fanden sich myopathische Befunde in der EMG und Histologie. In der Proteindiagnostik war der Dysferlin-Immunoblot zwar abgeschwächt, die Immunhistologie aber regelrecht. Bei ergebnisloser Mutationsanalyse konnte eine Dysferlinopathie ausgeschlossen werden.

Patient 15 zeigte eine asymmetrische Verteilung der Muskelschwäche. Auffällig wurde zuerst eine rechtsbetonte Fußheberschwäche im 12. Lebensjahr. Zwei Jahre später waren der rechte Unter- und Oberschenkel deutlich atrophisch und auch die Fußhebermuskulatur des linken Beines betroffen. Mit zunehmender Progredienz kam es zur Beteiligung auch der oberen Extremität und linksbetont der Handbinnenmuskulatur. Bioptisch lag eine degenerative Myopathie mit Einschlusskörperchen vor. Eine Proteindiagnostik ist bisher noch nicht erfolgt.

Auffällig war weiterhin, dass die Mutter die gleichen Symptome in etwas schwächerer Form zeigte, womit insgesamt der Verdacht auf eine autosomal-dominante vakuoläre Myopathie im Vordergrund steht.

Bei Patientin 16 kam es mit 59 Jahren zu einer Schwäche und Atrophie der Oberschenkelmuskulatur. Freies Treppensteigen wurde unmöglich, im Verlauf kam es auch zu Paresen der Muskulatur der Oberarme. Bei myopathischen Befunden im EMG und in der Histologie zeigte die Proteindiagnostik eine deutliche Abschwächung des Calpain-3-Immunoblots bei lediglich leicht verringerter Anfärbung für Dysferlin. In der entsprechenden Mutationsanalyse konnten keine Mutationen des Calpain-3-Gens oder des Dysferlin-Gens nachgewiesen werden.

Bei Patientin 17 wurde die Krankheit mit einer Schwäche der Oberschenkelmuskulatur und Problemen beim Treppensteigen mit 32 Jahren auffällig. Im Verlauf kam es nach etwa zehn Jahren zu einer Ausbreitung der Schwäche auf die Unterschenkelmuskulatur und den Schultergürtel. Die Patientin benötigt heute Unterarmgehstützen. In der Biopsie und der Elektromyographie zeigten sich deutlich myopathische Befunde, die CK war mit über 600 U/l erhöht. In der Proteindiagnostik fiel der komplette Verlust von Dysferlin in Immunoblot und Immunhistologie auf, der Calpain-3-Immunoblot war leicht reduziert. Die Patientin hat einen ebenfalls erkrankten Bruder, ihre beiden Töchter sind gesund. Aufgrund dieser Befunde besteht der starke Verdacht einer Dysferlinopathie mit sekundärer Calpain-3-Reduktion, der allerdings in der genetischen Untersuchung nicht bestätigt werden konnte.

E Diskussion

1 Das Dysferlin-Protein in der Übersicht

1.1 Aufbau und Struktur

Das Dysferlin-Gen beinhaltet 55 Exons mit einer Länge zwischen 30 und 461 Basenpaaren. Diese kodieren durch einen offenen Leserahmen mit insgesamt 6243 Basenpaaren ein Protein mit einer Länge von 2080 Aminosäuren. Das Dysferlin-Protein weist eine membranüberspannende Domäne nahe des C-Terminus (Aminosäuren 2047-2063) auf, was in einer plasmalemmalen Lokalisation des Proteins resultiert. Es wurden des weiteren sechs C2-Domänen homologe Bereiche nachgewiesen: C2A erstreckt sich über die Aminosäuren 32-82, C2B über 221-302, C2C über 431-475, C2D über 1160-1241, C2E über 1582-1660 und C2F über 1813-1926 (Liu et al. 1998, Davis et al. 2000). Eine schematische Darstellung findet sich in Abbildung 6.

1.2 Lokalisierung im Gewebe und den Muskelzellen

Northern Blot Untersuchungen zeigen eine Expression eines entsprechenden 7 kb Transkripts vorwiegend in Skelettmuskel, Herz und Plazenta, sowie Cerebellum und Medulla (Bashir et al. 1998).

Im Immunoblot zeigt sich Dysferlin als 230 kDa Bande im gesunden Gewebe. Am deutlichsten gelingt der Nachweis im Skelettmuskel, Herz, Nieren und Plazenta, schwach oder gar nicht in Gehirn, Leber, Milz, Ovarien und Hoden (Anderson et al. 1999, Matsuda et al. 1999). In der Immunhistologie zeigt sich, dass Dysferlin ähnlich wie Dystrophin an der Innenseite der Muskelmembran lokalisiert ist (Anderson et al. 1999, Matsuda et al. 1999). Dysferlin kann nicht an den Membranen der Basallamina, des Zellkerns, des endoplasmatischen oder sarkoplasmatischen Retikulums festgestellt werden (Anderson et al. 1999).

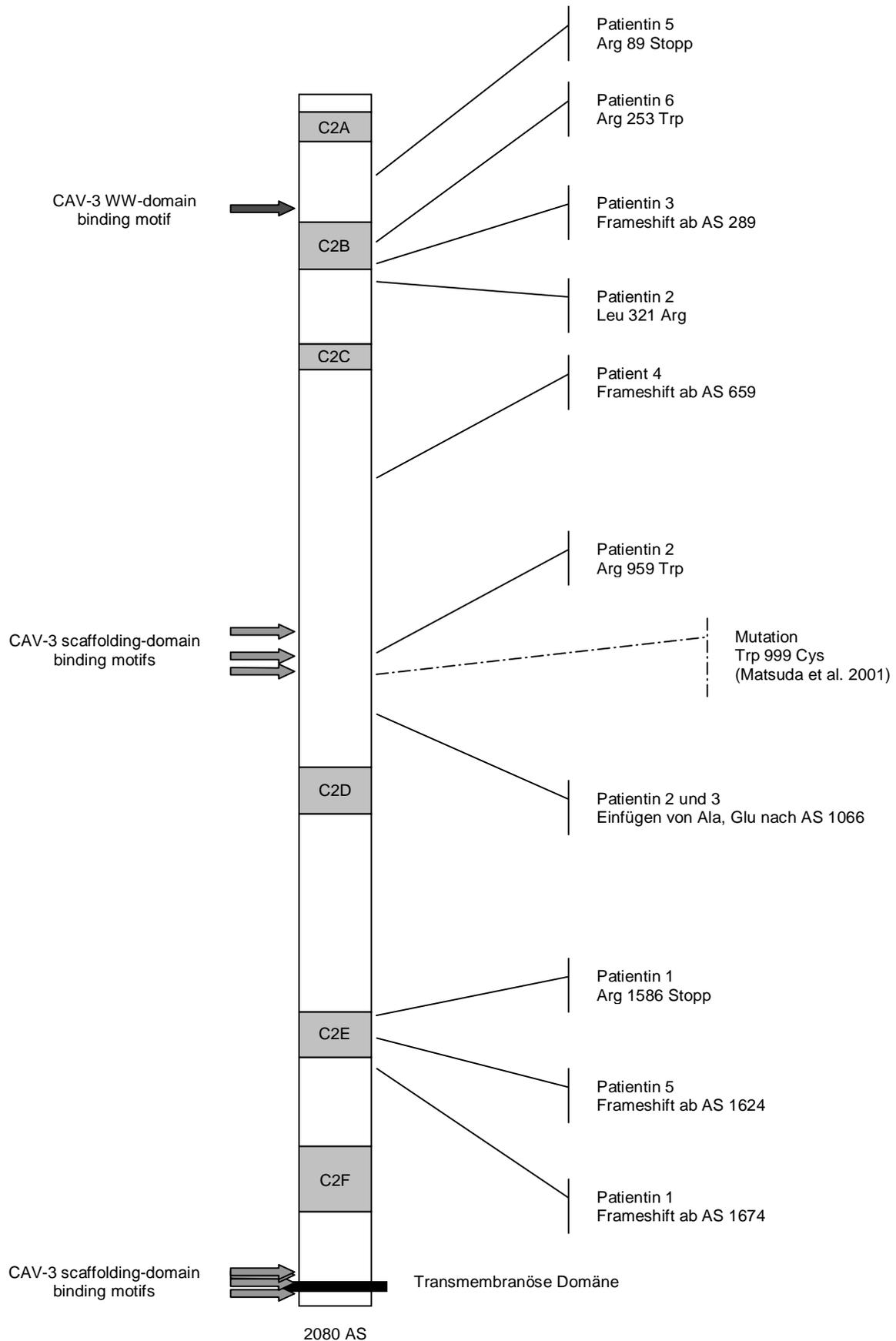


Abb. 6: Schema des Dysferlin-Proteins mit Darstellung der sechs C2-Domänen und der transmembranösen Domäne. Links sind die Abschnitte des Dysferlins gekennzeichnet, die mit den Scaffolding-Domänen und der WW-Domäne des Caveolin-3 korrespondieren (Matsuda et al. 2001). Rechts sind die Mutationen der Patienten 1-6, sowie die von Matsuda beschriebene Mutation im Bereich eines mit Caveolin-3 korrespondierenden Areals des Dysferlins angegeben.

1.3 Die Familie der Ferline und die Bedeutung der C2-Domänen

Eine wichtige Rolle für die Funktion des Proteins spielen die sechs (in Abbildung 4 dargestellten) C2-Domänen homologen Motive des Dysferlins (Liu et al. 1998, Davis et al. 2000). C2-Domänen sind für Signaltransduktion, Membrantransport und für die kalziumvermittelte Bindung von Phospholipiden von Bedeutung (Nalefski und Falke 1996, Rizo und Südhof 1998). Für C2-Domänen von Synaptotagminen wurde bei Membranschäden die kalziumregulierte Fusion von Lysosomen mit der Plasmamembran und damit der Verschluss der Läsionen nachgewiesen (Reddy et al. 2001).

Für die erste C2-Domäne (C2A) des Dysferlins konnte eine durch Kalzium induzierte Bindung von Phospholipiden experimentell belegt werden, für die anderen C2-Domänen besteht die Hypothese, dass diese eine Rolle in der Interaktion mit anderen Proteinen spielen (Davis et al. 2002).

C2-Domänen finden sich auch bei den anderen Angehörigen der Ferlin-Familie. Neben Dysferlin gibt es noch mindestens zwei weitere Mitglieder, Otoferlin und Myoferlin (Yasunaga et al. 1999, Davis et al. 2000). Myoferlin zeigt mit sechs C2-Domänen große Ähnlichkeit (68%ige Homologie) zu Dysferlin. Allerdings weist die Expression von Myoferlin in schwer und leicht betroffenen Dysferlinopathie-Patienten keine Unterschiede auf, eine Beeinflussung des Phänotyps erscheint hier also unwahrscheinlich (Vainzof et al. 2001). Des weiteren besteht Homologie zu Fer-1 (Liu et al. 1998, Bashir et al. 1998), einem Protein, das in der Spermiogenese von *Caenorhabditis elegans* bei der Fusion von membranösen Organellen mit der Plasmamembran eine wichtige Rolle spielt. Mutationen im Fer-1-Gen verhindern diese Fusion und resultieren in unbeweglichen Spermatozoen (Achanazar und Ward 1997).

Hohe Homologie (90%) besteht ebenfalls zum Maus-Dysferlin. Der SJL-Maus-Stamm ist ein natürliches Modell für die Dysferlinopathie mit autosomal-rezessiver Vererbung und progressiver Muskeldystrophie mit entzündlichen Veränderungen. Bei SJL-Mäusen liegt eine Deletion von 171 Basenpaaren vor, was beim menschlichen Dysferlin einer Deletion von Exon 45 entspricht. Damit ist auch ein Teil der in der Ferlin-Familie hochkonservierten C2E-Domäne betroffen, die in diesem Abschnitt liegt (Bittner et al. 1999, Vafiadaki et al. 2001).

Es ist also festzuhalten, dass bei Dysferlin und den weiteren Angehörigen der Familie die C2-Domänen eine wichtige Rolle bei der Phospholipid- und Proteinbindung spielen und es bei Mutationen zur Störung von Fusionsvorgängen kommen kann (Davis et al. 2002). Für den

Pathomechanismus lässt sich bezüglich der C2-Domänen folgendes Modell entwickeln: Bei Läsionen der Plasmamembran von Muskelzellen kommt es zum Einstrom von kalziumreicher Extrazellulärflüssigkeit. Unter diesem Einfluss beginnt ein (im Falle von Dysferlin durch C2-Domänen vermittelter) Reparaturmechanismus, bei dem cytoplasmatische Vesikel mit der Membran fusionieren und die Läsion verschließen (McNeil und Terasaki 2001).

Eine Korrelation zwischen Mutationen im Bereich von C2-Domänen und dem Phänotypen konnte allerdings bisher noch nicht festgestellt werden (Takahashi et al. 2003).

2 Vorbeschriebene Mutationen im Dysferlin-Gen

Grundlegend für die Erforschung des Dysferlin-Gens ist neben der Proteindiagnostik die molekulargenetische Analyse, um die Korrelation zwischen Geno- und den verschiedenen Phänotypen der Dysferlinopathie zu ermöglichen und um möglicherweise Auswirkungen einzelner Mutationen auf andere, interagierende, Proteine zu erkennen.

Die bisher bekannten Mutationen des Dysferlin-Gens beruhen vor allem auf Basenaustausch und sind ohne besondere Häufungen auf das gesamte Gen verteilt (Liu et al. 1998). Sie resultieren im Austausch von Aminosäuren, Leserasterverschiebungen (Frameshift-Mutationen) und im vorzeitigen Abbruch der Aminosäurekette (Stopp-Mutationen). Sie stören die Funktion des Proteins und führen zum Bild der Dysferlinopathie mit seinen verschiedenen Phänotypen.

Eine bekannte Ausnahme in der Häufigkeit einzelner Mutationen ist eine durch den Gründereffekt bedingte Häufung für eine Mutation bei libyschen Juden. In dieser Population tragen etwa 10% der Bevölkerung eine Deletion von Guanin an Nukleotidposition 1624 (Argov et al. 2000).

Des Weiteren finden sich bei japanischen Dysferlinopathie-Patienten relativ vermehrt die schon von Matsuda beschriebene Mutation an Nukleotidposition 3370 (Austausch von Guanin durch Thymin) in 19% der berichteten Fälle (6 von 31 Patienten) und eine Mutation an Position 1939 (Austausch von Cytosin durch Guanin) in 16% (5 von 31 Patienten).

Vier Patienten (drei davon mit dem Phänotyp der LGMD2B, einer mit dem der MM), bei denen die Mutation an Position 3370 homozygot vorliegt, zeigten dabei einen späteren Krankheitsbeginn und einen milderen Verlauf der Muskelschwäche als die anderen Patienten

in dieser Studie. Hier besteht der Verdacht, dass das bei diesen Patienten in der Proteindiagnostik noch sehr gering nachweisbare Dysferlin-Protein eine limitierte Funktion im Muskel erfüllen kann (Tagawa et al. 2003, Takahashi et al. 2003); eine Caveolin-3-Analyse wurde in diesen Fällen nicht vorgenommen. Ebenfalls relativ gehäuft bei japanischen Patienten finden sich eine Guanin-Deletion bei Position 3746 und eine Thymin-Deletion an Position 4870 (jeweils in drei von 20 untersuchten Familien). Patienten mit einem Basentausch von Guanin zu Adenin an Position 3510 zeigten einen schwereren Verlauf mit früherem Krankheitsbeginn und höheren CK-Werten als die anderen Patienten in dieser Untersuchung (Takahashi et al. 2003).

Saito berichtet außerdem von zwei Splicesite-Mutationen. Bei diesen Patienten konnte eine fleckige Immunfärbung für Dysferlin am Sarkolemma nachgewiesen werden, was die Expression eines mutierten, fragilen Proteins wahrscheinlich macht. Allerdings gab es keine Unterschiede im Krankheitsverlauf zwischen Dysferlin-negativen und noch Dysferlin-positiven Patienten (Saito et al. 2002)

Drei weitere Splicesite-Mutationen wurden an der Exon-Intron-Grenze von Exon 45 gefunden (Bashir et al. 1998, Cagliani et al. 2003), von denen eine auch mit entzündlichen Veränderungen einhergeht (McNally et al. 2000). Diese Mutationen resultieren in einem verkürzten oder in der Sequenz veränderten Dysferlin. Auch hier war aber keine eindeutige Zuordnung zu einem Phänotypen der Dysferlinopathie möglich.

2.1 Mutationen der Patienten 1 bis 6 in dieser Studie

Bei sechs der 17 untersuchten Patienten konnten insgesamt zehn Mutationen des Dysferlin-Gens festgestellt werden. Drei der zehn entdeckten Mutationen wurden bereits beschrieben, sieben Mutationen sind neu. Acht der hier beschriebenen Mutationen wurden als sicher pathogen eingeschätzt:

1. Sie wurden in 100 Normalkontrollen nicht gefunden.
2. Sie resultieren in einem vorzeitigen Abbruch der Aminosäurenkette bzw. einer strukturellen Änderung des Proteins.
3. Sie kosegregieren mit der Erkrankung im Stammbaum im Sinne eines autosomal-rezessiven Erbgangs.
4. Sie verursachen den Verlust von Dysferlin-Protein im Skelettmuskel.

2.1.1 Mutation in Exon 30: 6bp-Insertion mit fraglicher Signifikanz

Bei Patientin 2 liegt diese Mutation neben zwei Punktmutationen in Exon 11 und 27 vor, bei Patientin 3 besteht weiterhin eine Frameshift-Mutation in Exon 9.

Hier ergeben sich zwei denkbare Hypothesen: Zum einen könnte es sich bei der Insertion von 6 Basenpaaren lediglich um einen Polymorphismus handeln (die Mutation findet sich in 2 von 100 Normalkontrollen). In diesem Falle wäre allerdings eine im Rahmen dieser Studie nicht diagnostizierte zweite pathogene Mutation des Dysferlin-Gens bei Patientin 3 zu fordern. Denkbar ist aber auch, dass diese Insertion ein mutiertes Dysferlin-Protein zur Folge hat, was zur Instabilität und dem beschleunigten Abbau des Proteins führt. In der Immunhistologie und im Immunoblot war ein Signal in der erwarteten Länge nur nach verlängerter Expositionszeit sehr schwach feststellbar.

2.1.2 Mutation in Exon 7: Punktmutation mit fraglicher Signifikanz

Bei Patientin 6 konnte neben der Punktmutation in Exon 7 mit einem daraus resultierenden Aminosäuretausch keine weitere Mutation in den anhand der cDNA untersuchten Anteilen des Dysferlin-Gens entdeckt werden. Wie beschrieben gilt es bei dieser Patientin außerdem, eine mögliche autosomal-dominant vererbte Krankheit und, bei Vorliegen einer pathogenen Mutation im FKRP-Gen, eine mögliche LGMD2I auszuschließen.

2.1.3 Mutationen mit möglicher Bedeutung für eine entzündliche Symptomatik

Bei Patientin 2 liegt des weiteren eine, bei der Dysferlinopathie unregelmäßig auftretende, entzündliche Komponente der Erkrankung vor. Die Mutationen dieser Patientin sind in diesem Zusammenhang allerdings noch nicht bekannt geworden. Für den Aminosäuretausch an Position 959 wurden lediglich erhöhte CK-Werte bei heterozygotem Vorliegen bei den Eltern beschrieben (Cagliani et al. 2003).

Bei Patientin 5 führt das Vorliegen der Guanin-Deletion an Position 5345, für die ein gehäuftes (bei 5 von 29 für diese Mutation homozygoten Patienten) Auftreten von Entzündung beschrieben wurde, nicht zu einer entsprechenden Symptomatik (Argov et al. 2000).

2.1.4 Mutationen im Bereich von C2-Domänen

Drei der hier beschriebenen Mutationen von Patienten mit gesicherter Dysferlinopathie liegen in C2-Domänen. In C2B liegt eine Frameshift-Mutation der LGMD2B-Patientin 3 (Adenin-Insertion an Nukleotidposition 1237), eine weitere Mutation in diesem Bereich wurde bei zwei MM-Patienten identifiziert (Takahashi et al. 2003).

Zwei weitere Mutationen liegen in C2E. Hierbei handelt es sich zum einen um eine Stopp-Mutation an Aminosäureposition 1586 der MM-Patientin 1, zum anderen um die Frameshift-Mutation (Guanin-Deletion an Nucleotidposition 5345) der LGMD2B-Patientin 5. Für die letztere ist gesichert, dass sie bei beiden Phänotypen vorkommen kann (Bashir et al. 1998, Liu et al. 1998).

Auch für die C2-Domänen A und F sind Mutationen beschrieben, die den Phänotypen der MM, der LGMD2B und bezüglich C2F auch der DMAT bedingen können (Illarioshkin et al. 2000, Ueyama et al. 2001, Liu et al. 1998). Für C2C ist bisher nur eine Mutation bei einem MM-Patienten bekannt, für C2D wurden bisher noch keine Mutationen veröffentlicht.

Insgesamt erscheint vor diesem Hintergrund eine Beeinflussung des Phänotypen durch die C2-Domänen alleine unwahrscheinlich.

2.2 Interaktion mit Caveolin-3 und Calpain-3

2.2.1 Caveolin-3

Caveolin-3 ist wesentlicher Bestandteil der caveolären Membran (Way und Parton 1996, Tang et al. 1996). Caveolae sind vesikuläre Invaginationen der Plasmamembran und an Transportvorgängen und Signaltransduktionen beteiligt (Lisanti et al. 1995).

Auch coimmunopräzipitiert Dysferlin mit Caveolin-3 im Lysat von gesundem Muskel, was eine Interaktion der beiden Proteine nahe legt. In einer Studie von Matsuda wurde bei einem Patienten mit LGMD2B auch eine sekundäre Abschwächung des Caveolin-3 in der Proteindiagnostik festgestellt. Eine Analyse der Aminosäuresequenz des Dysferlins ergibt sieben Motive, die mit den so genannten Scaffolding-Bindungsdomänen des Caveolin-3 korrespondieren. Ein weiteres Motiv korrespondiert mit der WW-Bindungsdomäne des Caveolin-3 (Abbildung 4). Der Patient hat eine Missense-Mutation bei Aminosäureposition

999 und damit in einem der Motive, das mit einer Scaffolding-Domäne des Caveolin-3 übereinstimmt (Matsuda et al. 2001).

Ein weiterer Hinweis für eine mögliche Interaktion von Dysferlin und Caveolin-3 fand sich in einem C2C12-Zellmodell. Hier konnte bei der Blockierung der Caveolin-3-Expression festgestellt werden, dass Dysferlin bei Beginn der Differenzierung von Myotuben zwar vorhanden ist, in Abwesenheit von Caveolin-3 aber keinen weiteren Anstieg zeigt, wie es bei unbehandelten Zellen der Fall ist. In diesem Fall kam es nicht zur Ausdifferenzierung der Myotuben (Capanni et al. 2003).

Dies legt die Hypothese nahe, dass Dysferlin und Caveolin-3 miteinander in funktioneller Verbindung stehen und dass die Auswirkung unterschiedlicher Dysferlin-Mutationen auf das Caveolin-3-Protein den Phänotyp beeinflussen können.

Bei den Patienten 1, 3 und 4 konnte eine sekundäre Reduktion von Caveolin-3 festgestellt werden, während Patientinnen 2 und 5 normale Caveolin-3 Ergebnisse in der Proteindiagnostik zeigten. Für Patient 4 konnte die Caveolin-3 Reduktion nur in der Immunhistologie diagnostiziert werden, ein Immunoblot konnte mangels Untersuchungsmaterial nicht durchgeführt werden. Eine Beeinflussung des Phänotyps kann hier folglich nicht gefordert werden, da bei den Patienten 1 und 4 eine MM, bei Patientin 3 eine LGMD2B diagnostiziert wurde. In der Literatur wurde bisher ein LGMD2B-Patient mit einer Beeinträchtigung des Caveolin-3 beschrieben (Matsuda et al. 2001).

Auch liegt keine der Mutationen der Patienten 1, 3 und 4 im Bereich der Motive des Dysferlins, die mit den so genannten Scaffolding-Bindungsdomänen oder der WW-Bindungsdomäne des Caveolin-3 korrespondieren. Bei Patientin 3, die die stärkste Reduktion von Caveolin-3 zeigte, liegt die Insertion der 2 Aminosäuren 70 Positionen weiter in Richtung des C-Terminus, also weit außerhalb der entsprechenden Motive. Bei dieser Patientin lässt sich im Rahmen der oben aufgestellten Hypothese bezüglich der 6-bp-Insertion in Exon 30 folgendes spekulieren: Caveolin-3 bindet an das mutierte, instabile aber dennoch exprimierte Dysferlin-Protein. Der so entstandene Komplex kann aber nicht an das Sarkolemma binden und wird bevorzugt abgebaut. Folge ist neben der Abwesenheit von Dysferlin die deutliche Reduktion von Caveolin-3.

Dagegen zeigte Patientin 2, deren Mutation an Aminosäureposition 959 in unmittelbarer Nähe zwischen zwei der Scaffolding-Bindungsdomänen korrespondierenden Motiven (Aminosäurepositionen 924-931 und 965-972) liegt, keine Reduktion von Caveolin-3. Ein direkter Bezug der Mutationen zu diesen Motiven als Erklärung für eine Caveolin-3-Reduktion erscheint also nicht zwingend notwendig.

Für eine Rolle der C2-Domänen in den Proteininteraktion lassen sich hier keine näheren Aussagen treffen, lediglich bei der Domäne C2E lässt sich beobachten, dass hier sowohl Mutationen von Patienten mit sekundärer Reduktion (Patientin 1) und ohne Reduktion (Patientin 5) von Caveolin-3 vorkommen.

2.2.2 Calpain-3

Bei den Patientinnen 3 und 5 lagen normale Ergebnisse für Calpain-3 vor, wie auch bei Patientin 6, die hier aber aufgrund der noch unsicheren Diagnose unberücksichtigt bleiben soll. Die Patientinnen 1 und 2 zeigten eine Reduktion von Calpain-3. Bei Patient 4 konnte mangels Untersuchungsmaterial keine Calpain-3-Diagnostik durchgeführt werden.

Bei der Betrachtung der jeweiligen Mutationen fällt auf, dass Patientinnen 3 und 5 jeweils mit einer Mutation bereits sehr früh, bei Aminosäureposition 89 und 289, eine Störung des Dysferlin-Proteins zeigen.

Bei den anderen Patientinnen liegen die Mutationen jeweils an später gelegenen Positionen. Eine denkbare Hypothese ist folglich auch hier, dass ein mutiertes und verkürztes Protein gebildet werden kann, welches aber noch in der Lage ist, Calpain-3 zu beeinflussen. Handelt es sich um eine indirekte Interaktion, so könnte auf diese Weise ein noch unbekannter Interaktionspartner beeinträchtigt werden, der dann in der Folge zu einer Calpain-3-Reduktion führt. Liegen Mutationen aber bereits sehr früh im Protein vor, ist keinerlei Interaktion möglich, es kommt damit auch nicht zu einem vermehrten Abbau von Calpain-3.

Andererseits wurden aber in der Literatur bereits Patienten mit normalen Calpain-3 Werten beschrieben, die Mutationen in den späteren Bereichen des Gens zeigen. Es handelt sich hierbei in drei Fällen um eine homozygote Punktmutation an Aminosäureposition 791 (Aminosäuretausch Prolin zu Arginin) und in einem Fall um eine heterozygote Frameshift-Mutation, wie sie auch hier bei Patientin 5 an Position 1624 vorliegt. Die korrespondierende Mutation ist für diesen Fall nicht bekannt (Anderson et al. 2000).

Bei vier weiteren betroffenen Familien mit gesicherten Dysferlin-Mutationen zeigte sich dagegen eine Reduktion von Calpain-3, wobei alle diese Mutationen deutlich nach Aminosäureposition 289 liegen. Auffällig ist hier bei einem Patienten eine homozygot vorliegende, große Deletion der Aminosäuren 838 bis 1058. Ein Patient aus einer anderen Familie zeigte in diesem Bereich heterozygot einen Aminosäuretausch bei Position 1038, die zweite Mutation ist ein Frameshift (Insertion bei Nucleotidposition 6353), die ebenfalls in einer anderen Familie mit einer Calpain-3-Reduktion in Erscheinung tritt. Auch eine der Mutationen von Patientin 2 an Position 959 liegt in diesem Areal. Diese Patientin zeigte auch die deutlichste Reduktion von Calpain-3 der hier untersuchten Patienten, ein Befund, der bei einem von Cagliani beschriebenen Patienten mit dieser Mutation allerdings nicht vorlag. (Anderson et al. 2000, Cagliani et al. 2003).

Bezüglich der Bedeutung der C2-Domänen lässt sich hier festhalten, dass die in C2B liegende Mutation von Patientin 3 keine sekundäre Reduktion von Calpain-3 verursacht. Auch für die Domäne C2E ist trotz einer Mutation von Patientin 5, anders als für Patientin 1, in diesem Bereich keine Abschwächung von Calpain-3 feststellbar.

Des Weiteren lässt sich hier kein Zusammenhang zwischen einer sekundären Calpain-3-Abschwächung und dem Phänotypen feststellen.

2.2.3 Zusammenfassend zu den Interaktionen

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die hier dargestellten Ergebnisse einen starken Hinweis auf eine Interaktion zwischen Dysferlin und Caveolin-3 und Calpain-3 geben. Allerdings bestehen bezüglich der genauen Mechanismen dieser Interaktion noch viele offene Fragen. Es muss geklärt werden, ob die Interaktion zwischen den Proteinen direkt oder indirekt verläuft, und welche Bereiche des Dysferlin-Gens von kritischer Bedeutung für die Interaktion sind. Für Calpain-3 könnte ein solcher Bereich z.B. in der Spanne der von Anderson beschriebenen Deletion der Aminosäuren 838 bis 1058 liegen.

In Dysferlinopathie-Patienten besteht ein vollkommener Verlust von Dysferlin, während Caveolin-3 und Calpain-3 normal oder variabel stark reduziert vorliegen können. Für Caveolin-3 wäre eine mögliche Erklärung, dass Dysferlin im Vergleich zu Caveolin-3 weniger stark mit der Zellmembran assoziiert. Demnach wäre Caveolin-3 von der Abwesenheit des interagierenden Partners weniger betroffen (Matsuda et al. 2001). Auch die

Auswirkungen auf die Formation und Funktion der Caveolae, die im Rahmen der LGMD1C und der Rippling Muscle Disease stark eingeschränkt ist, ist im Falle einer sekundären Abschwächung von Caveolin-3 noch ungeklärt (Minetti et al. 2002, Kubisch et al. 2003).

Bei der Erforschung der pathogenetischen Mechanismen zwischen den Proteinen sind aber auch Proteinreduktionen zu berücksichtigen, die nicht als sekundäre Folge einer Dysferlinopathie zu betrachten sind und so zu falschen Ergebnissen führen können. Dazu gehört die sekundäre Verminderung von Proteinen durch andere Muskelerkrankungen. Für Calpain-3 wurde z.B. eine Reduktion im Rahmen der DMD nachgewiesen, auch ist hier der rasche Abbau von Calpain-3 durch enzymatischen Abbau bei falscher Aufbereitung des Untersuchungsmaterials zu berücksichtigen (Anderson et al. 2000).

Um diese Fragen zu beantworten sind weitere Studien mit detaillierter Protein- und molekularer Diagnostik nötig. So können die Auswirkungen von Mutationen auf die Expression von Proteinen und somit funktionelle und pathogenetische Mechanismen, wie sie für Dysferlin anhand der sechs C2-Domänen nahe liegen, weiter aufgeklärt werden.

3 Limitation der Methode

Das hier untersuchte Material wurde aus Muskelzellen oder -biopsat als RNA gewonnen und durch RT-PCR in cDNA übersetzt. Dies ermöglicht eine Analyse der kodierenden Regionen des Gens. Allerdings zeigt diese Methode einige Einschränkungen, denn so können Mutationen außerhalb der kodierenden Regionen, zum Beispiel in regulierenden Bereichen (Promoter-Regionen) nicht erfasst werden. Auch heterozygote, große Deletionen in einem Allel können auf diese Weise nicht entdeckt werden (Anderson et al. 2000).

Eine weitere Schwierigkeit besteht in der Möglichkeit der genetischen Heterogenität beim Phänotyp der MM. Bei Haplotypenanalysen von niederländischen MM-Patienten konnte in drei von vier untersuchten Familien der Genlocus für MM auf Chromosom 2 ausgeschlossen werden, zwei dieser Familien zeigten einen möglichen Genlocus auf Chromosom 10, wobei als klinisch hinweisend ein späterer Krankheitsbeginn und eine asymmetrische Verteilung der Muskelschwäche beschrieben wurden (Linssen et al. 1998). Für die dritte Familie konnte kein Genlocus identifiziert werden. Auch in einer anderen Studie konnten für fünf Patienten mit der klinischen Diagnose der MM in der molekulargenetischen Untersuchung des Dysferlin-

Gens keine Mutationen gefunden werden, hier wird ebenfalls als ein möglicher Grund eine genetische Heterogenität für diesen Phänotypen in Betracht gezogen (Takahashi et al. 2003). Unterstützt wird dies durch Tagawa, der bei seinen MM-Patienten in 25% der Fälle weder eine Reduktion des Proteins, noch eine Mutation im Dysferlin-Gen nachweisen konnte (Tagawa et al. 2003).

Es gilt also zu beachten, dass sowohl bei Mutationen von Dysferlin unabhängigen Proteinen einerseits, als auch von mit Dysferlin interagierenden Proteinen andererseits ähnliche Phänotypen verursacht werden könnten. Mögliche Kandidaten für den letzteren Fall wären hier zum Beispiel Annexin-1 und -2 (Lennon et al. 2003).

4 Kritische Bewertung der Diagnostik bei den untersuchten Patienten dieser Studie

Wie eingangs dargestellt beruht die sichere Diagnostik der Dysferlinopathie auf der Zusammenschau der klinischen Untersuchung, der Anamnese, der Proteinanalytik und schließlich auf dem genetischen Nachweis von Dysferlin-Mutationen.

Bei den Patienten 1-5 entsprachen klinische Parameter, Anamnese, Proteindiagnostik mit vollkommenem Verlust von Dysferlin in Immunhistologie und Immunoblot dem Bild der Dysferlinopathie; dies wurde durch die gefundenen Mutationen bestätigt.

Dagegen fanden sich keine Dysferlin-Mutationen bei den Patienten, die im Immunoblot positive (Patienten 7, 11-13) oder allenfalls reduzierte (Patienten 10, 14 und 16) Ergebnisse für Dysferlin zeigten, selbst wenn in der Immunhistologie der ersten Gruppe in allen Fällen eine Reduktion oder ein Verlust von Dysferlin auffällig war (Tabelle 5 und 8). Vor diesem Hintergrund muss also ein Immunoblot immer durchgeführt werden, um eine Dysferlin-Reduktion in der Immunhistologie zu überprüfen.

Zusammenfassend kann anhand der hier untersuchten Patienten festgehalten werden, dass nach Berücksichtigung von Klinik und Anamnese die Proteindiagnostik wegweisend für die Diagnosestellung ist. Ein positiver Befund für Dysferlin im Immunoblot macht eine Dysferlinopathie sehr unwahrscheinlich (4 von 17 Patienten). Ein lediglich reduziertes Vorliegen von Dysferlin im Immunoblot korrespondierte in 3 Fällen nicht mit Mutationen des Dysferlin-Gens, bei Patientin 6 steht die letztendliche Diagnose noch aus.

Die Immunhistologie ist diesbezüglich unzuverlässig, bei den hier untersuchten Patienten wurde in drei Fällen reduziertes oder fehlendes Dysferlin festgestellt, während der Immunoblot eindeutig positiv war. Bei den 5 Patienten mit gesicherter Dysferlinopathie konnte kein Dysferlin in der Immunhistologie nachgewiesen werden.

Ebenso ist ein negativer Befund für Dysferlin im Immunoblot kein absolut sicheres Kriterium für eine Dysferlinopathie, bei 2 von 7 Patienten mit einem solchen Befund konnten keine Dysferlin-Mutationen gefunden werden.

Anhand dieser beiden Patienten zeigt sich, dass eine vollkommene Abwesenheit von Dysferlin in der Proteinanalyse allein keine sichere Diagnostik der Dysferlinopathie ermöglicht, sondern die genaue klinische Untersuchung (z.B. Histologie) und die genetische Analyse unverzichtbar sind.

5 Weiterführende Überlegungen und Ausblick auf die Therapie

Durch weitere Patientenstudien und Versuche mit Zellkulturen, in denen Genotyp-Phänotyp-Korrelationen und Proteininteraktionen des Dysferlins erforscht werden, kann unser Verständnis der normalen Funktion des Dysferlins, der funktionellen Vernetzung von Muskelproteinen in der gesunden Zelle, den pathologischen Vorgängen bei Dysferlindefizienz und der phänotypischen Variabilität der Dysferlinopathie, gerade hinsichtlich einer sicheren Diagnostik und neuer Therapieformen, verbessert werden.

Als Beispiel für die Bedeutung der Diagnostik sei hier Patientin 10 genannt, die klinisch den Phänotyp der LGMD2B zeigt. Erst durch die molekulare Diagnostik konnte die Dysferlinopathie ausgeschlossen und eine LGMD2I gesichert werden. Während die Dysferlinopathie in der Regel keine kardiopulmonalen Komplikationen zeigt, ist dies bei der LGMD2I mit größerer Häufigkeit der Fall. Selbst bei relativ geringen muskulären Symptomen kann es zu Kardiomyopathien und respiratorischer Insuffizienz kommen (Poppe et al. 2003). Eine frühe und genaue Diagnose hat hier also weitreichende Konsequenzen für Therapie und Lebensplanung.

Für die Dysferlinopathie gibt es zur Zeit noch keine bekannte und erprobte medikamentöse Therapie. Die bei der DMD erfolgreich wirkenden Steroide wurden bisher noch nicht systematisch an anderen Muskeldystrophien getestet. Und auch bei der DMD gibt es z.B. noch nicht geklärte Fragen bezüglich des besten Therapieregimes mit den geringsten

Nebenwirkungen. Die zugrunde liegenden Ursachen eines positiven Steroideffekts bei Muskeldystrophien sind bislang unklar; es werden sowohl membran-stabilisierende Effekte als auch anti-inflammatorische Mechanismen diskutiert.

Auch bei Dysferlinopathie-Patienten wurde bereits ohne positiven Effekt eine hochdosierte Kurzzeittherapie mit Steroiden angewendet, doch stand in diesen Fällen als falsche Behandlungsdiagnose eine inflammatorische Myopathie im Vordergrund (Rowin et al. 1999, Argov et al. 2000, McNally et al. 2000).

Der Nutzen einer Steroidtherapie bei DMD und auch in einem Fall von Sarkoglykanopathie (Angelini et al. 1998) ist zwischenzeitlich international anerkannt, so dass eine systematische Erprobung von Steroiden in einer klinischen Studie bei Dysferlinopathie gerechtfertigt scheint, zumal durch die hier beschriebene molekulare Analyse die Krankheitsdiagnose sicher gestellt und die entsprechenden Patienten in die Studie aufgenommen werden können. Eine solche Studie des Friedrich-Baur-Instituts hat im Jahr 2004 begonnen.

Im Bereich der Molekulartherapie sind in den letzten Jahren neue Ansätze entwickelt worden, die derzeit an MD-Zellkulturen und Tiermodellen untersucht werden. Erste klinische Phase-I-Gentherapiestudien werden derzeit an Patienten mit Sarkoglykanopathien durchgeführt. Weitere Ansätze sind das Hochregulieren homologer Ersatzmoleküle (z. B. Utrophin bei DMD) oder der Einsatz von pluripotenten Stammzellen (Walter und Lochmüller 2001). Ersteres könnte auch bei der Dysferlinopathie ein möglicher Ansatz sein, da in der Familie der Ferline eine hohe Homologie zwischen den Proteinen besteht. Ein möglicher Kandidat wäre eventuell Myoferlin, das zu Dysferlin hochgradig homolog ist und in der Muskelzellentwicklung funktionell mit Dysferlin in Verbindung steht (Davis et al. 2002). Denkbar ist ebenso, dass bisher noch nicht entdeckte Ferline oder mit Dysferlin interagierende Proteine eine solche Rolle übernehmen könnten (Piccolo et al. 2000). Des Weiteren wird in der Literatur in Dysferlin-defizienten Mäusen ein weiterer Reparaturmechanismus beschrieben, der im geringen Maße in geschädigten Zellen dieser Tiere aktiv ist (Lennon et al. 2003). Auch hier wäre an eine Hochregulierung der verantwortlichen Proteine zu denken. Hierfür stehen mit den SJL-Mäusen natürlich vorkommende Tiermodelle zur Verfügung (Bittner et al. 1999).

Weitere in der Erforschung befindliche molekulare Therapiemethoden sind der Vektor-gestützte Gentransfer, mit dem Ziel, gesunde Dysferlin cDNA in den geschädigten Muskel zu transferieren, sowie die Zelltherapie. In einem Versuch mit der Transplantation gesunder allogener Maus-Myoblasten in SJL-Mäuse konnte die Expression von Dysferlin in den behandelten Tieren nachgewiesen werden (Leriche-Guérin et al. 2002).

Zum jetzigen Zeitpunkt sind jedoch noch zahlreiche technische und methodische Probleme zu lösen, bevor molekulare Therapieformen eine kausale, kurative und sichere Behandlung darstellen können (Walter und Lochmüller 2001). Um diese Fragen bei der relativen Seltenheit der einzelnen MD-Formen zu beantworten, ist eine stärker vernetzte nationale und internationale Zusammenarbeit dringend erforderlich (Walter et al. 2002).

F Zusammenfassung

Die Dysferlinopathie ist eine Erkrankung aus dem Formenkreis der Gliedergürtel-Muskeldystrophien. Sie wird verursacht durch autosomal-rezessiv vererbte Mutationen, die drei klinisch heterogene Phänotypen verursachen können: Die Gliedergürtel-Muskeldystrophie Typ 2B (LGMD2B), die Miyoshi Myopathie (MM) und die distale anterior tibiale Myopathie (DMAT). Betroffen sind initial dementsprechend unterschiedliche Muskelgruppen.

Dysferlin ist an der Plasmamembran der Muskelzelle lokalisiert, bei Mutationen des Dysferlin-Gens kommt es zum Verlust des Proteins. Dysferlin ist Mitglied der Proteinfamilie der Ferline. Diese zeichnen sich durch hohe Homologie und das Vorkommen von C2-Domänen aus, die von großer funktioneller Bedeutung für Fusionsvorgänge an der Plasmamembran sind. Dysferlin spielt eine entscheidende Rolle bei Reparaturmechanismen der Plasmamembran der Muskelzelle. Proteininteraktionen mit anderen Proteinen der Muskelzelle können die Funktion von Dysferlin beeinflussen und potentiell Auswirkungen auf die Ausprägung des jeweiligen Phänotypen bei Dysferlinopathie zeigen.

Um ein zuverlässiges Diagnosesystem zu etablieren und einen Beitrag zur klinischen und therapeutischen Bedeutung der molekularen Diagnostik sowie zum Verständnis der Pathophysiologie der Erkrankung zu leisten, wurden 17 Patienten untersucht.

Bei sechs Patienten wurden bei der molekulargenetischen Diagnostik Mutationen des Dysferlin-Gens gefunden. Diese Ergebnisse wurden mit den Befunden von klinischen und technischen Untersuchungen sowie der Proteindiagnostik von Dysferlin und den möglichen Interaktionspartnern Caveolin-3 und Calpain-3 korreliert. Bei fünf dieser sechs Patienten konnte die Diagnose einer Dysferlinopathie gestellt werden, bei zehn Patienten wurde die Erkrankung ausgeschlossen, in zwei Fällen gelang weder der sichere Ausschluss noch der Nachweis einer Dysferlinopathie.

Hinsichtlich der Proteininteraktionen des Dysferlin konnte im Rahmen der durchgeführten Proteindiagnostik ein deutlicher Hinweis für eine Interaktion mit den Proteinen Caveolin-3 und Calpain-3 erbracht werden. Welchen genauen Charakter die Interaktion zwischen Dysferlin und Caveolin-3 und Calpain-3 hat, muss noch weiter erforscht werden, denn feste "regelhafte" Auswirkungen der hier gefundenen Dysferlin-Mutationen z.B. auf den Phänotyp der Erkrankung konnten in dieser Arbeit nicht festgestellt werden.

In diesem Kontext muss auch die Rolle von Mutationen noch weiter aufgeklärt werden, die in den C2-Domänen zu liegen kommen. Diesbezüglich können die hier dargestellten Ergebnisse zusammen mit den Daten zukünftiger Studien zur pathogenetischen Klärung beitragen.

Es konnte die diagnostische Eignung der hier beschriebenen molekulargenetischen Untersuchung bei dieser heterogenen Erkrankung gesichert und darüber hinaus ein Beitrag zum pathophysiologischen Verständnis der Erkrankung hinsichtlich der Bedeutung der C2-Domänen des Dysferlins und der Proteininteraktionen geleistet werden. Die Ergebnisse bieten, neben der Bedeutung für den einzelnen Patienten, eine Grundlage für die weitere Erforschung der Dysferlinopathie.

G Literaturverzeichnis

Achanazar WE, Ward S (1997). **A nematode gene required for sperm vesicle fusion.** *J Cell Sci*; 110: 1073-1081.

Allamand V, Campbell KP (2000). **Animal models for muscular dystrophy: valuable tools for the development of therapies.** *Hum Mol Genet*; 9: 2459-2467.

Anderson LVB (1996). **Optimized protein diagnosis in the autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophies.** *Neuromuscul Disord*; 6: 443-446.

Anderson LVB, Davison K, Moss JA, Young C, Cullen MJ, Walsh J, Johnson MA, Bashir R, Britton S, Keers S, Argov Z, Mahjneh I, Fougerousse F, Beckmann JS, Bushby KMD (1999). **Dysferlin is a plasma membrane protein and is expressed early in human development.** *Hum Mol Genet*; 8: 855-861.

Anderson LV, Harrison RM, Pogue R, Vafiadaki E, Pollitt C, Davison K, Moss JA, Keers S, Pyle A, Shaw PJ, Mahjneh I, Argov Z, Greenberg CR, Wrogemann K, Bertorini T, Goebel HH, Beckmann JS, Bashir R, Bushby KM (2000). **Secondary reduction in calpain 3 expression in patients with limb girdle muscular dystrophy type 2B and Miyoshi myopathy (primary dysferlinopathies).** *Neuromuscul Disord*; 10: 553-559.

Angelini C, Fanin M, Menegazzo E, Freda MP, Duggan DJ, Hoffman EP (1998). **Homozygous alpha-sarcoglycan mutation in two siblings: one asymptomatic and one steroid-responsive mild limb-girdle muscular dystrophy patient.** *Muscle Nerve*; 21: 769-775.

Angelini A, Fanin M, Vlak M, Padovan R (2000). **Distal myopathies.** *Acta Myol*; 19: 221-225.

Aoki M, Liu J, Richard I, Bashir R, Britton S, Keers SM, Oeltjen J, Brown HE, Marchand S, Bourg N, Beley C, McKenna-Yasek D, Arahata K, Bohlega S, Cupler E, Illa I, Majneh I, Barohn RJ, Urtizberea JA, Fardeau M, Amato A, Angelini C, Bushby K, Beckmann JS, Brown RH Jr (2001). **Genomic organization of the dysferlin gene and novel mutations in Miyoshi myopathy.** *Neurology*; 57: 271-278.

Argov Z, Sadeh M, Mazor K, Soffer D, Kahana E, Eisenberg I, Mitrani-Rosenbaum S, Richard I, Beckmann J, Keers S, Bashir R, Bushby K, Rosenmann H (2000). **Muscular dystrophy due to dysferlin deficiency in Libyan Jews.** *Brain*; 123: 1229-1237.

Babychuk EB, Draeger A (2000). **Annexins in cell membrane dynamics. Ca(2+)-regulated association of lipid microdomains.** *J Cell Biol*; 150: 1113-1124.

Bansal D, Miyake K, Vogel SS, Groh S, Chen CC, Williamsom R, McNell PL, Campbell KP (2003). **Defective membrane repair in dysferlin-deficient muscular dystrophy.** *Nature*; 423: 168-172.

Bashir R, Strachan T, Keers S, Stephenson A, Mahjneh I, Marconi G, Nashef L, Bushby KMD (1994). **A gene for autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophy maps to chromosome 2p.** *Hum Mol Genet*; 3: 455-457.

Bashir R, Keers S, Strachan T, Passos-Bueno R, Zatz M, Weissenbach J, Le Paslier D, Meissler M, Bushby K (1996). **Genetic and physical mapping at the limb-girdle muscular dystrophy locus (LGMD2B) on chromosome 2p**. *Genomics*; 33: 46-52.

Bashir R, Britton S, Strachan T, Keers S, Vafiadaki E, Lako M, Richard I, Marchand S, Bourg N, Argov Z, Sadeh M, Mahjneh I, Marconi G, Passos-Bueno MR, Moreira ES, Zatz M, Beckmann JS, Bushby K (1998). **A gene related to *Caenorhabditis elegans* spermatogenesis factor *fer-1* is mutated in limb-girdle muscular dystrophy type 2B**. *Nat Genet*; 20: 37-42.

Beckmann JS (1999). **66th/67th ENMC sponsored international workshop: The limb girdle muscular dystrophies**. *Neuromuscul Disord*; 9: 436-445.

Bejaoui K, Hirabayashi K, Hentati F, Haines JL, Ben-Hamida C, Belal S, Miller RG, McKenna_Yasek D, Weissenbach J, Rowland LP, Griggs RC, Munsat TL, Ben Hamida M, Arahata K, Brown RH Jr (1995). **Linkage of Miyoshi myopathy (distal autosomal recessive muscular dystrophy) locus to chromosome 2p12-14**. *Neurology*; 45: 768-772.

Bejaoui K, Liu J, McKenna-Yasek D, Le Paslier D, Bossie K, Gilligan DM, Brown RH (1998). **Genetic fine mapping of the Miyoshi myopathy locus and exclusion of eight candidate genes**. *Neurogenetics*; 1: 189-196.

Betz RC, Schoser BG, Kasper D, Ricker K, Ramirez A, Stein V, Torbergesen T, Lee YA, Nothen MM, Wienker TF, Malin JP, Propping P, Reis A, Mortier W, Jentsch TJ, Vorgerd M, Kubisch C (2001). **Mutations in *CAV3* cause mechanical hyperirritability of skeletal muscle in rippling muscle disease**. *Nat Genet*; 28: 218-219.

Bittner RE, Anderson LVB, Burkhardt E, Bashir R, Vafiadaki E, Ivanova S, Raffelsberger T, Maerk I, Höger H, Jung M, Karbasiyan M, Storch M, Lassmann H, Moss JA, Davison K, Harrison R, Bushby KMD, Reis A (1999). **Dysferlin deletion in SJL mice (SJL-Dysf) defines a natural model for limb girdle muscular dystrophy**. *Nat Genet*; 23: 141-142.

Bonifati MD, Ruzza G, Bonometto P, Berardinelli A, Gorni K, Orcesi S, Lanzi G, Angelini C (2000). **A multicenter, double-blind, randomized trial of deflazacort versus prednisone in Duchenne muscular dystrophy**. *Muscle Nerve*; 23: 1344-1347.

Brockington M, Yuva Y, Prandini P, Brown SC, Torelli S, Benson MA, Herrmann R, Anderson LV, Bashir R, Burgunder JM, Fallet S, Romero N, Fardeau M, Straub V, Storey G, Pollitt C, Richard I, Sewry CA, Bushby K, Voit T, Blake DJ, Muntoni F (2001a). **Mutations in the fukutin-related protein gene (FKRP) identify limb girdle muscular dystrophy 2I as a milder allelic variant of congenital muscular dystrophy MDC1C**. *Hum Mol Genet*; 10: 2851-2859.

Brockington M, Blake DJ, Prandini P, Brown SC, Torelli S, Benson MA, Ponting CP, Estournet B, Romero NB, Mercuri E, Voit T, Sewry CA, Guicheney P, Muntoni F (2001b). **Mutations in the fukutin-related protein gene (FKRP) cause a form of congenital muscular dystrophy with secondary laminin alpha2 deficiency and abnormal glycosylation of alpha-dystroglycan**. *Am J Hum Genet*; 69: 1198-1209.

Brooke MH, Fenichel GM, Griggs RG, Mendell JR, Moxley RT 3rd, Miller JP, Kaiser KK, Florence JM, Pandya S, Signore L, et al (1987). **Clinical investigation of Duchenne muscular dystrophy. Interesting results in a trial of prednisone.** Arch Neurol; 44: 812-817.

Bushby KMD, Beckmann JS (1995). **Report of the 30th and 31st ENMC international workshop on the limb-girdle muscular dystrophies – proposal for a new nomenclature.** Neuromuscul Disord; 5: 337-344.

Bushby K (1998). **The limb-girdle muscular dystrophies.** In: Emery AEH (Hrsg.): Diagnostic Criteria for Neuromuscular Disorders. 2. Aufl., London: Royal Society of Medicine Press; 17-22.

Bushby K (1999). **Making sense of the limb-girdle muscular dystrophies.** Brain; 122: 1403-1420.

Bushby KMD (2000). **Dysferlin deficiency - clinical and molecular insight.** Acta Myol; 19: 209-213.

Cagliani R, Fortunato F, Giorda R, Rodolico C, Bonaglia MC, Sironi M, D'Angelo MG, Prella A, Locatelli F, Toscano A, Bresolin N, Comi GP (2003). **Molecular analysis of LGMD-2B and MM patients: identification of novel DYSF mutations and possible founder effect in the Italian population.** Neuromuscul Disord; 13: 788-795.

Capanni C, Sabatelli P, Mattioli E, Ognibene A, Columbaro M, Lattanzi G, Merlini L, Minetti C, Maraldi NM, Aquarzone S (2003). **Dysferlin in a hyperCKaemic patient with caveolin 3 mutation and in C2C12 cells after p38 MAP kinase inhibition.** Exp Mol Med; 35: 538-544.

Carbone I, Bruno C, Sotgia F, Bado M, Broda P, Masetti E, Panella A, Zara F, Bricarelli FD, Cordone G, Lisanti MP, Minetti C (2000). **Mutation in the CAV3 gene causes partial caveolin-3 deficiency and hyperCKemia.** Neurology; 54: 1373-1376.

Chomczynski P, Sacchi N (1987). **Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction.** Anal Biochem; 162: 156-159.

Davis DB, Delmonte AJ, Ly CT, McNally EM (2000). **Myoferlin, a candidate gene and potential modifier of muscular dystrophy.** Hum Mol Genet; 9: 217-226.

Davis DB, Doherty KR, Delmonte AJ, McNally EM (2002). **Calcium-sensitive phospholipid binding properties of normal and mutant ferlin C2 domains.** J Biol Chem; 277: 22883-22888.

de Paula F, Vainzof M, Passos-Bueno MR, de Cassia M Pavanello R, Matioli SR, Anderson LVB, Nigro V, Zatz M (2002). **Clinical variability in calpainopathy: what makes the difference?** Eur J Hum Genet; 10: 825-832.

Dubowitz V (2000). **75th European Neuromuscular Centre International Workshop: 2nd workshop on the treatment of muscular dystrophy 10-12 December, 1999, Naarden, The Netherlands.** Neuromuscul Disord; 10: 313-320.

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 (2001). **The UDP-N-acetylglucosamine 2-epimerase/N-acetylmannosamine kinase gene is mutated in recessive hereditary inclusion body myopathy.** *Nat Genet*; 29: 83-87.

Ellis AE (2003). **Patches for wounded muscle.** *Nature*; 423: 129-131.

Emery AE (1991). **Population frequencies of inherited neuromuscular diseases – a world survey.** *Neuromuscul Disord*; 1: 19-29.

Erb WH (1891). **Dystrophia muscularis progressiva: Klinische und pathologisch-anatomische Studien.** *Dtsch Z Nervenheilkd*; 1: 13.

Fanin M, Pegoraro E, Matsuda-Asada C, Brown RH Jr., Angelini C (2001). **Calpain-3 and dysferlin protein screening in patients with limb-girdle dystrophy and myopathy.** *Neurology*; 56: 660-665.

Fanin M, Angelini C (2002). **Muscle pathology in dysferlin deficiency.** *Neuropathol Appl Neurobiol*; 28: 461-470.

Fenichel GM, Florence JM, Pestronk A, Mendell JR, Moxley RT 3rd, Griggs RC, Brooke MH, Miller JP, Robison J, King W, et al (1991). **Long-term benefit from prednisone therapy in Duchenne muscular dystrophy.** *Neurology*; 41: 1874-1877.

Flachenecker P, Kiefer R, Naumann M, Handwerker M, Reichmann H (1997). **Distal muscular dystrophy of Miyoshi type.** *J Neurol*; 244: 23-29.

Forst R, Hausmann B, Rienäcker B (1984). **Zur krankengymnastischen Behandlung der Duchenne-Muskeldystrophie.** *Krankengymnastik*; 36: 81-85.

Gallardo E, Rojas-Garcia R, De Luna N, Pou A, Brown RH Jr, Illa I (2001). **Inflammation in dysferlin myopathy: Immunohistochemical characterization of 13 patients.** *Neurology*; 57: 2136-2138.

Hartigan-O'Connor D, Chamberlain JS (2000). **Developments in gene therapy for muscular dystrophy.** *Microsc Res Tech*; 48: 223-238.

Illa I, Serrano-Munuera C, Gallardo E, Lasa A, Rojas-Garcia R, Palmer J, Gallano P, Baiget M, Matsuda C, Brown RH Jr (2001). **Distal anterior compartment myopathy: a dysferlin mutation causing a new muscular dystrophy phenotype.** *Ann Neurol*; 49: 130-134.

Illarioshkin SN, Ivanova-Smolenskaya IA, Tanaka H, Vereshchagin NV, Markova ED, Poleshchuk VV, Lozhnikova SM, Sukhorukov VS, Limborska SA, Slominsky PA, Bulayeva KB, Tsuji S (1996). **Clinical and molecular analysis of a large family with three distinct phenotypes of progressive muscular dystrophy.** *Brain*; 119: 1895-1909.

Illarioshkin SN, Ivanova-Smolenskaya IA, Greenberg CR, Nylén E, Sukhorukov VS, Poleshchuk VV, Markova ED, Wrogemann K (2000). **Identical dysferlin mutation in limb girdle muscular dystrophy type 2B and distal myopathy.** *Neurology*; 55: 1931-1933.

Karpati G, Lochmüller H (2001). **When running a stop sign may be a good thing.** Ann Neurol; 49: 693-694.

Kubisch C, Schoser BG, von Düring M, Betz RC, Goebel HH, Zahn S, Ehrbrecht A, Aasly J, Schroers A, Popovic N, Lochmüller H, Schroder JM, Bruning T, Malin JP, Fricke B, Meinck HM, Torbergesen T, Engels H, Voss B, Vorgerd M (2003). **Homozygous mutations in caveolin-3 cause a severe form of rippling muscle disease.** Ann Neurol; 53: 512-520.

Laval SH, Bushby KM (2004). **Limb-girdle muscular dystrophies – from genetics to molecular pathology.** Neuropathol Appl Neurobiol; 30: 91-105.

Lennon NJ, Kho A, Bacskai BJ, Perlmutter SL, Hyman BT, Brown RH Jr (2003). **Dysferlin interacts with annexins A1 and A2 and mediates sarcolemmal wound-healing.** J Biol Chem; 278: 50466-50473.

Leriche-Guérin K, Anderson LVB, Wrogemann K, Roy B, Goulet M, Tremblay JP (2002). **Dysferlin expression after normal myoblast transplantation in SCID and in SJL mice.** Neuromuscul Disord; 12: 167-173.

Linszen, WHJP, Notermans NC, Van der Graaf Y, Wokke JHJ, Van Doorn PA, Höweler CJ, Busch HFM, De Jager AEJ, De Visser M (1997). **Myoshi-type distal muscular dystrophy. Clinical spectrum in 24 Dutch patients.** Brain; 120: 1989-1996.

Linszen WHJP, De Visser M, Notermans NC, Vreyling JP, Van Doorn PA, Wokke JHJ, Baas F, Bolhuis PA (1998). **Genetic heterogeneity in Myoshi-type distal muscular dystrophy.** Neuromuscul Disord; 8: 317-320.

Lisanti MP, Tang Z, Scherer PE, Kubler E, Koleske AJ, Sargiacomo M (1995). **Caveolae, transmembrane signalling and cellular transformation.** Mol Membr Biol; 12: 121-124.

Liu J, Aoki M, Illa I, Wu C, Fardeau M, Angelini C, Serrano C, Urtizberea JA, Hentati F, Ben Hamida M, Bohlega S, Culper EJ, Amato AA, Bossie K, Oeltjen J, Bejaoui K, McKenna-Yasek D, Hosler BA, Schurr E, Arahata K, de Jong PJ, Brown RH Jr (1998). **Dysferlin, a novel skeletal muscle gene, is mutated in Miyoshi myopathy and limb girdle muscular dystrophy.** Nat Genet; 20: 31-36.

Mahjneh I, Pasos-Bueno R, Zatz M, Vainzof M, Marconi G, Nashef L, Bashir R, Bushby K (1996). **The phenotype of chromosome 2p linked limb girdle muscular dystrophy.** Neuromuscul Disord; 6: 483-490.

Mahjneh I, Marconi G, Bushby K, Anderson LVB, Tolvanen-Mahjneh H, Somer H (2001). **Dysferlinopathy (LGMD2B): a 23-year follow-up study of 10 patients homozygous for the same frameshift dysferlin mutation.** Neuromuscul Disord; 11: 139-145.

Matsuda C, Aoki M, Hayashi YK, Ho MF, Arahata K, Brown RH Jr (1999). **Dysferlin is a surface membrane-associated protein that is absent in Miyoshi myopathy.** Neurology; 53: 1119-1122.

Matsuda C, Hayashi YK, Ogawa M, Aoki M, Murayama K, Nishino I, Nonaka I, Arahata K, Brown RH Jr (2001). **The sarcolemmal proteins dysferlin and caveolin-3 interact in skeletal muscle.** Hum Mol Genet; 10: 1761-1766.

- McNally EM, Ly CT, Rosenmann H, Mitrani-Rosenbaum S, Jiang W, Anderson LVB, Soffer D, Argov Z (2000). **Splicing mutation in dysferlin produces limb-girdle muscular dystrophy with inflammation.** *Am J Med Genet*; 91: 305-312.
- McNeil PL, Terasaki M (2001). **Coping with the inevitable: how cells repair a torn surface membrane.** *Nat Cell Biol*; 3: E124-129.
- Mendell JR, Moxley RT, Griggs RC, Brooke MH, Fenichel GM, Miller JP, King W, Signore L, Pandya S, Florence JM, et al (1989). **Randomized, double-blind six-month trial of prednisone in Duchenne's muscular dystrophy.** *N Engl J Med*; 320: 1592-1597.
- Mesa LE, Dubrovsky AL, Corderi J, Marco P, Flores D (1991). **Steroids in Duchenne muscular dystrophy - deflazacort trial.** *Neuromusc Disord*; 1: 261-266.
- Minetti C, Sotgia F, Bruno C, Scartezzini P, Broda P, Bado M, Masetti E, Mazzocco M, Egeo A, Donati MA, Volonte D, Galbiati F, Cordone G, Bricarelli FD, Lisanti MP, Zara F (1998). **Mutations in the caveolin-3 gene cause autosomal dominant limb-girdle muscular dystrophy.** *Nat Genet*; 18: 365-368.
- Minetti C, Bado M, Broda P, Sotgia F, Bruno C, Galbiati F, Volonte A, Lucania G, Pavan A, Bonilla E, Lisanti MP, Cordone G (2002). **Impairment of caveolae formation and T-system disorganization in human muscular dystrophy with caveolin-3 deficiency.** *Am J Pathol*; 160: 265-270.
- Miyoshi K, Kawai H, Iwasa M, Kuska K, Nishino H (1986). **Autosomal recessive distal muscular dystrophy as a new type of progressive muscular dystrophy. Seventeen cases in eight families including an autopsied case.** *Brain*; 109: 31-54.
- Morisaki T, Gross M, Morisaki H, Pongratz D, Zollner N, Holmes EW (1992). **Molecular basis of AMP deaminase deficiency in skeletal muscle.** *Proc Natl Acad Sci USA*; 89: 6457-6461.
- Mullis KB (1990). **Target amplification for DNA analysis by the polymerase chain reaction.** *Ann Biol Clin*; 48: 579-582.
- Nakagawa M, Matsuzaki T, Suehara M, Kanzato N, Takashima H, Higuchi I, Matsumura T, Goto K, Arahata K, Osame M (2001). **Phenotypic variation in a large Japanese family with Miyoshi myopathy with nonsense mutation in exon 19 of dysferlin gene.** *J Neurol Sci*; 184: 15-19.
- Nalefski EA, Falke JJ (1996). **The C2 domain calcium-binding motif: structural and functional diversity.** *Protein Sci*; 5: 2375-2390.
- Ono Y, Shimada H, Sorimachi H, Richard I, Saido TC, Beckmann JS, Ishiura S, Suzuki K (1998). **Functional defects of a muscle-specific calpain, p94, caused by mutations associated with limb-girdle muscular dystrophy type 2A.** *J Biol Chem*; 273:17073-17078.

Passos-Bueno R, Bashir R, Moreira ES, Vainzof M, Marie SK, Vasquez L, Iughetti P, Bakker E, Keers S, Stephenson A, Strachan T, Mahneh I, Weissenbach J, Bushby K, Zatz M (1995). **Confirmation of the 2p locus for the mild autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophy gene (LGMD 2B) in three families allows refinement of the candidate region.** Genomics; 27: 192-195.

Passos-Bueno MR, Moreira ES, Marie SK, Bashir R, Vasquez L, Love DR, Vainzof M, Iughetti P, Oliveira JR, Bakker E, Strachan T, Bushby K, Zatz M. (1996). **Main clinical features of the three mapped autosomal recessive muscular dystrophies and estimated proportion of each form in 13 Brazilian families.** J Med Genet; 33: 97-102.

Piccolo F, Moore SA, Ford GC, Campbell KP (2000). **Intracellular accumulation and reduced sarcolemmal expression of dysferlin in limb-girdle muscular dystrophies.** Ann Neurol; 48: 902-912.

Pogue R, Anderson LVB, Pyle A, Sewry C, Pollitt C, Johnson MA, Davison K, Moss JA, Mercuri E, Muntoni F, Bushby KM (2001). **Strategy for mutation analysis in the autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophies.** Neuromuscul Disord; 11: 80-87.

Pollitt C, Anderson LV, Pogue R, Davison K, Pyle A, Bushby KM (2001). **The phenotype of calpainopathy: diagnosis based on a multidisciplinary approach.** Neuromuscul Disord; 11: 287-296.

Poppe M, Cree L, Bourke J, Eagle M, Anderson LV, Birchall D, Brockington M, Buddles M, Busby M, Muntoni F, Wills A, Bushby K (2003). **The phenotype of limb-girdle muscular dystrophy type 2I.** Neurology; 60: 1246-1251.

Raynal P, Pollard HB (1994). **Annexins: the problem of assessing the biological role for a gene family of multifunctional calcium- and phospholipid-binding proteins.** Biochim Biophys Acta; 1197: 63-93.

Reddy A, Caler EV, Andrews NW (2001). **Plasma membrane repair is mediated by Ca(2+)-regulated exocytosis of lysosomes.** Cell; 106:157-69.

Richard I, Broux O, Allamand V, Fougerousse F, Chiannikulchai N, Bourg N, Brenguier L, Devaud C, Pasturaud P, Roudaut C, et al (1995). **Mutations in the proteolytic enzyme calpain 3 cause limb-girdle muscular dystrophy type 2A.** Cell; 81: 27-40.

Rizo J, Südhof TC (1998). **C₂-domains, structure and function of a universal Ca²⁺-binding domain.** J Biol Chem; 273: 15879-15882.

Rowin J, Meriggioli MN, Cochran EJ, Sanders DB (1999). **Prominent inflammatory changes on muscle biopsies in patients with Miyoshi myopathy.** Neuromuscul Disord; 9: 417-420.

Saito A, Higuchi I, Nakagawa M, Saito M, Hirata K, Suehara M, Yoshida Y, Takahashi T, Aoki M, Osame M (2002). **Miyoshi myopathy patients with novel 5' splicing donor site mutations showed different dysferlin immunostaining at the sarcolemma.** Acta Neuropathol; 104: 615-620.

- Selcen D, Stilling G, Engel A (2001). **The earliest pathologic alterations in dysferlinopathy.** *Neurology*; 56: 1472-1481.
- Tagawa K, Ogawa M, Kawaba K, Yamanaka G, Matsumura T, Goto K, Nonaka I, Nishino I, Hayashi YK (2003). **Protein and gene analyses of dysferlinopathy in a large group of Japanese muscular dystrophy patients.** *J Neurol Sci*; 21: 23-28.
- Takahashi T, Aoki M, Tateyama M, Kondo E, Mizuno T, Onodera Y, Takano R, Kawai H, Kamakura K, Mochizuki H, Shizuka-Ikeda M, Nakagawa M, Yoshida Y, Akanuma J, Hoshino K, Saito H, Nishizawa M, Kato S, Saito K, Miyachi T, Yamashita H, Kawai M, Matsumura T, Kuzuhara S, Ibi T, Sahashi K, Nakai H, Kohnosu T, Nonaka I, Arahata K, Brown RH Jr, Saito H, Itoyama Y (2003). **Dysferlin mutations in Japanese Miyoshi myopathy.** *Neurology*; 60: 1799-1804.
- Tang Z, Scherer PE, Okamoto T, Song K, Chu C, Kohtz DS, Nishimoto I, Lodish HF, Lisanti MP (1996). **Molecular cloning of caveolin-3, a novel member of the caveolin gene family expressed predominantly in muscle.** *J Biol Chem*; 271: 2255-2261.
- Ueyama H, Kumamoto T, Nagao S, Masuda T, Horinouchi H, Fujimoto S, Tsuda T (2001). **A new dysferlin gene mutation in two Japanese families with limb-girdle muscular dystrophy 2B and Myoshi myopathy.** *Neuromuscul Disord*; 11: 139-145.
- Vafiadaki E, Reis A, Keers S, Harrison R, Anderson LVB, Raffelsberger T, Ivanova S, Hoger H, Bittner RE, Bushby K, Bashir R (2001). **Cloning of the mouse dysferlin gene and genomic characterization of the SJL-Dysf mutation.** *Neuroreport*; 12: 625-629.
- Vainzof M, Anderson LV, McNally EM, Davis DB, Faulkner G, Valle G, Moreira ES, Pavanello RC, Passos-Bueno MR, Zatz M (2001). **Dysferlin protein analysis in limb-girdle muscular dystrophies.** *J Mol Neurosci*; 17: 71-80.
- Vainzof M, Zatz M (2003). **Protein defects in neuromuscular diseases.** *Braz J Med Biol Res*; 36: 543-555.
- Walter MC, Lochmuller H, Reilich P, Klopstock T, Huber R, Hartard M, Hennig M, Pongratz D, Muller-Felber W (2000). **Creatine monohydrate in muscular dystrophies: A double-blind, placebo-controlled clinical study.** *Neurology*; 54: 1848-1850.
- Walter MC, Lochmüller H (2001). **Novel approaches to treat muscular dystrophies.** *Expert Opin Investig Drugs*; 10: 695-707.
- Walter MC, Pongratz D, Lochmüller H (2002). **Diagnostik und Therapie bei Muskeldystrophien.** *Nervenheilkunde*; 1: 17-23.
- Walton JN, Natrass F (1954). **On the classification, natural history and treatment of the myopathies.** *Brain*; 77: 169-231.

Way M, Parton RG 1996. **M-caveolin, a muscle-specific caveolin-related protein.** FEBS Lett; 378: 108-112.

Weiler T, Greenberg CR, Nylén E, Halliday W, Morgan K, Eggertson D, Wrogemann K (1996). **Limb-girdle muscular dystrophy and Miyoshi myopathy in an aboriginal Canadian kindred map to LGMD2B and segregate with the same haplotype.** Am J Hum Genet; 59: 872-878.

Weiler T, Bashir R, Anderson LVB, Davison K, Moss JA, Britton S, Nylén E, Keers S, Vafiadaki E, Greenberg CR, Bushby KMD, Wrogemann K (1999). **Identical mutation in patients with limb girdle muscular dystrophy type 2B or Miyoshi myopathy suggests a role for modifier gene(s).** Hum Mol Genet; 8: 871-877.

Yasunaga, S, Grati M, Cohen-Salmon M, El-Amraoui A, Mustapha M, Salem N, El-Zir, E, Loiselet J, Petit C (1999). **A mutation in OTOF, encoding otoferlin, a FER-1-like protein, causes DFNB9, a nonsyndromic form of deafness.** Nat Genet; 21: 363-369.

H Anhang

Danksagung

Lebenslauf

Danksagung

Als erstes möchte ich Herrn Prof. Dr. Hanns Lochmüller sehr herzlich für die interessante Aufgabenstellung, die sehr gute und intensive Betreuung und seine Unterstützung im Verlaufe dieser Arbeit danken.

Mein besonderer Dank gilt auch Frau PD Dr. Maggie C. Walter und Frau PD Dr. Angela Abicht, die durch ihre Beratung und beim Erlernen der molekularbiologischen Techniken zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben.

Für die außergewöhnlich gute Atmosphäre im Labor, die freundschaftliche Zusammenarbeit und die immer zur Verfügung stehende Hilfsbereitschaft bedanke ich mich herzlich bei Dr. Patrick Dunant, Nicolai Grundhoff, Ursula Klutzny, Dr. Nancy Larochelle, Juliane Müller, Eva Schmidtmayer, Dr. In-Ho Song, Dr. Rolf Stucka und Dr. Christian Thirion.

Nicht zuletzt gebührt großer Dank auch meinen Eltern, meiner Freundin Tanja und all denen, die mich während der Arbeit an dieser Dissertation ohne Vorbehalte unterstützt und manches Mal auch ausgehalten haben. Danke.

Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name: Christian Braun
Adresse: Kottwitzstr. 39, 20253 Hamburg

Geburtsdatum: 11.05.1971
Geburtsort: Memmingen
Familienstand: Ledig
Staatsangehörigkeit: Deutsch

Schulische Ausbildung

1977 - 81 Grundsule an der Peslmüllerstraße, München
1981 - 89 Kurt-Huber-Gymnasium, Gräfelfing
1989 - 90 McLaughlin Collegiate and Vocational Institute, Oshawa, Kanada
1990 - 92 Kurt-Huber-Gymnasium, Gräfelfing

Zivildienst

1992 - 93 Kreiskrankenhaus Pasing, München

Berufliche Ausbildung

1993 - 95 MMM Münchener Medizin Mechanik GmbH, Planegg
▪ Ausbildung zum Industriekaufmann

1995 - 96 Fachhochschule München, Studium der Betriebswirtschaftslehre
1996 - 2003 Ludwig-Maximilians-Universität, München, Studium der Medizin
▪ Ärztliche Vorprüfung September 1998
▪ 1. Staatsexamen August 1999
▪ 2. Staatsexamen April 2002
▪ 3. Staatsexamen April 2003

Beruflicher Werdegang

15.09.03 - 14.03.04 Arzt im Praktikum, Bezirkskrankenhaus Günzburg, Klinik für forensische Psychiatrie und Psychotherapie (Ärztlicher Direktor Dr. med. E. Baljer)

seit 15.03.04 Arzt im Praktikum/Assistenzarzt, Institut für Rechtsmedizin des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf (Institutsleiter Prof. Dr. med. K. Püschel)

