

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

Evaluation der Pathogenität
kurzer Repeat-Expansionen im DM2-Genlocus
der Myotonen Dystrophie Typ 2

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

vorgelegt von

Helena Ellrott

aus

München

2013

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München**

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Benedikt Schoser

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. Wolfgang Müller-Felber
Priv.-Doz. Dr. med. Dieter Kutz
Prof. Dr. med. Roman Haberl

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

Tag der mündlichen Prüfung: 24.10.2013

Teile dieser Arbeit wurden und werden vorgetragen und veröffentlicht in:

International Myotonic Dystrophy Consortium-8 (30.11.2011 - 3.12.2011) Clearwater, Florida, *Evaluation of the pathogenicity of short repeat expansions at the DM2 gene locus*, Helena Ellrott, Birgit Neitzel, Angela Abicht, Birgit Czermin, Christa Doerner, Ian Holt, Lubov Timchenko, Wolfram Kress, Benedikt Schoser

Forschung in der Neurologie (26.01.2012), Ludwig Maximilians Universität, München
Wie kurz muss das CCUG-Repeat sein, um eine DM2 diagnostizieren zu können?
Helena Ellrott, Birgit Neitzel, Angela Abicht, Wolfram Kress, Benedikt Schoser

21. Kongress des Wissenschaftlichen Beirates der Deutschen Gesellschaft für Muskelkranke e.V. (28.02. - 02.03.2013) Aachen,
Kurze Repeat-Expansionen im DM2-Genlocus bei der Myotonen Dystrophie Typ 2. Wie kurz muss das CCUG-Repeat sein, um eine DM2 diagnostizieren zu können?
Helena Ellrott, Birgit Neitzel, Angela Abicht, Wolfram Kress, Benedikt Schoser

Evaluation of the pathogenicity of short repeat expansions at the DM2 gene locus, Helena Ellrott, Angela Abicht, Birgit Czermin, Ian Holt, Wolfram Kress, Benedikt Schoser
Neurology 2013 in Vorbereitung

Inhaltsverzeichnis

I.	Einleitung.....	6
II.	Molekularpathogenese – Myotone Dystrophie, Typ 1 und Typ 2	8
III.	Zielsetzung	11
IV.	Phänotyp-Beschreibung	12
V.	Material und Methoden.....	18
	5.1 Immunhistochemie.....	18
	5.2 Fluoreszenz in situ Hybridisierung	19
	5.3 Triplet-Repeat-Primed PCR.....	20
	5.4 PCR und Gelelektrophorese.....	20
	5.5 Southern Blot	21
	5.6 Klonierung und Sequenzierung der genomischen DNA.....	21
	5.6.1 Klonierung	21
	5.6.2 PCR der Klone	22
	5.6.2.1 PCR der Klone mit Puffer A und M13-Primern (1. Pickung)	22
	5.6.2.2 PCR der Klone mit Puffer A und M13-Primern (2. Pickung)	22
	5.6.2.3 PCR der Klone mit Puffer J und 58-HPCL-gereinigten Primern	22
	5.6.3 Sequenzierung der Klone	23
	5.7 CLCN1 splicing assay	24
VI.	Ergebnisse.....	25
	6.1 Immunhistochemie.....	25
	6.2 Fluoreszenz in situ Hybridisierung	27
	6.3 Triplet-Repeat-Primed PCR.....	28
	6.4 PCR und Gelelektrophorese.....	31
	6.4.1 Ergebnisse in Kooperation mit dem Institut für Humangenetik Würzburg.....	31
	6.4.2 Ergebnisse in Kooperation mit dem Medizinisch Genetischen Zentrum München	32
	6.5 Southern Blot	33
	6.5.1 Ergebnisse in Kooperation mit dem Institut für Humangenetik Würzburg.....	33
	6.5.2 Ergebnisse in Kooperation mit dem Medizinisch Genetischen Zentrum München	34
	6.6 Klonierung und Sequenzierung der genomischen DNA.....	35
	6.6.1 Klonierung	35
	6.6.2 PCR der Klone	35
	6.6.2.1 PCR der Klone mit Puffer A und M13-Primern (1. Pickung)	35
	6.6.2.2 PCR der Klone mit Puffer A und M13-Primern (2. Pickung)	37
	6.6.2.3 PCR der Klone mit Puffer J und 58-HPCL-gereinigten Primern	37
	6.6.3 Sequenzierung der Klone	38
	6.7 CLCN1 splicing assay	39
VII.	Diskussion	40

VIII. Zusammenfassung	42
IX. Literaturverzeichnis	43
X. Appendix.....	47
10.1 Abkürzungsverzeichnis.....	47
10.2 Untersuchungsübersicht.....	48
10.3 Schriftliche Einverständniserklärung.....	49
10.4 Danksagung	50
10.5 Lebenslauf.....	51
10.6 Eidesstattliche Versicherung.....	52

I. Einleitung

Myotone Dystrophien sind die häufigsten erblichen Muskelerkrankungen des Erwachsenenalters. Sie werden autosomal dominant vererbt, ihre Inzidenz liegt bei 1:10.000 - 1:20.000 [1, 2, 3].

Bereits 1909 wurde von dem deutschen Neurologen Hans Steinert und seinen englischen Kollegen Batten und Gibb die klassische Form der Myotonen Dystrophie, Typ 1 (DM1), beschrieben (Abb. 1) [4, 5]. 1936 wurde sie als eine multisystemische Erkrankung klassifiziert, d. h. neben der Erkrankung der Muskulatur können weitere Organsysteme des Körpers betroffen sein [2, 6]. Erst 1992 gelang die Entschlüsselung der genetischen Ursache der DM1, ein abnorm expandiertes CTG-Triplett-Repeat im 3'UTR des Dystrophia-Myotonica-Proteinkinase-Gens (DMPK-Gen) auf Chromosom 19q13.32 [2, 7, 8]. Bei gesunden Personen finden sich bis zu 37 CTG-Kopien, bei DM1-Patienten zwischen 50 und 4000 CTG-Kopien [1, 9]. Die Länge der CTG-Repeat-Expansion korreliert mit dem Beginn und der Schwere der klinischen Manifestation, ein frühes Manifestationsalter (20. - 50. Lebensjahr) und ein rascher und schwerer Verlauf sind häufig [1]. Eine genetische Antizipation, d. h. ein zunehmend früherer Erkrankungsbeginn und schwererer Verlauf in den nachfolgenden Generationen, lässt sich beobachten [2, 3, 10, 11, 12]. Die allgemeine Lebenserwartung von Patienten mit einer DM1 ist deutlich reduziert [13, 14]. Bei maternaler Vererbung besteht ein erhöhtes Risiko für eine schwere kongenitale Form der DM1 (CDM) [2, 3, 15]. Hauptsymptome der DM1 sind eine Relaxierungsstörung der Muskulatur, die sog. Myotonie, Muskelschwäche und Muskelatrophie, sowie früh auftretende Katarakte. Auch eine orofazial-distale Beteiligung kann auftreten [1]. Als multisystemische Affektionen anderer Organsysteme sind kardiale Arrhythmien (AV-Block I°-III°), eine dilatative Kardiomyopathie, endokrine Störungen (z. B. Diabetes mellitus, Hodenatrophie, Ovarialinsuffizienz), Intelligenzminderung und kognitive Einschränkungen (Fatigue, Tagesmüdigkeit, kognitive Störungen) typische Krankheitszeichen, die aber nicht obligat parallel vorhanden sein müssen [1, 11, 12].



Abb. 1 Hans Steinert (1875 - 1911), Erstbeschreibung der Myotonen Dystrophie 1, 1909 [4]

Mit der Möglichkeit der genetischen Untersuchung seit 1992 fielen Patienten mit Symptomen auf, die mit denen der DM1 vergleichbar waren, bei denen aber keine CTG-Triplet-Repeat-Expansion nachgewiesen werden konnte. Ricker und Moxley beschrieben dieses Phänomen erstmals 1994 als eine zweite Form der Myotonen Dystrophie (DM2, Abb. 2) [1, 16]. Da bei diesen Patienten vor allem eine proximale Schwäche und Myalgien im Vordergrund stehen, erhielt diese Form in Europa den Namen „Proximale Myotone Myopathie“ und in den USA „myotonic dystrophy with no trinucleotide repeat expansion“ [17]. 1998 gelang die Lokalisation des Krankheitsgens auf Chromosom 3q21.3 durch Laura Ranum [18]. Die genetische Ursache dieser zweiten Form der Myotonen Dystrophie wurde 2001 entdeckt. Es handelt sich um ein abnorm expandiertes Tetranukleotid-CCTG-Repeat im Intron 1 des Zinkfinger-9-Gens (ZNF-9, OMIM 116955) auf Chromosom 3q21.3. Als normal gelten bis zu 27 CCTG-Kopien. Das kleinste, bisher in der Literatur beschriebene Krankheitsallel hatte 75 CCTGs [9]. Die meisten DM2-Patienten haben ein expandiertes Allel mit mehr als 5000 CCTG-Repeats [9]. Zwischen der CCTG-Repeat-Länge und dem Beginn und der Schwere der Erkrankung ist keine eindeutige Korrelation erkennbar, eine Antizipation ist, im Gegensatz zur DM1, mit Ausnahme einer Arbeit von Schneider C. aus dem Jahr 2000, nicht beschrieben [9, 19]. Auch bei dieser zweiten Form handelt es sich, wie bei der DM1, um eine multisystemische, autosomal dominant vererbte Muskelerkrankung. Die späte Manifestation kann sehr variabel sein, tritt aber meistens ab der 4. - 5. Lebensdekade auf. Die Krankheit verläuft meist milder, eine kognitive Beeinträchtigung tritt in der Regel nicht auf, aber sowohl eine Fatigue, wie auch eine visuospatiale Störung können assoziiert sein. Eindeutige kongenitale Fälle wurden in der Literatur bisher nicht beschrieben [10, 20, 21], Frühsymptome können aber eine Erhöhung der Kreatinkinase und eine Erhöhung der Gamma-Glutamyl-Transferase (γ -GT) sein (Schoser, persönliche Mitteilung). Im Gegensatz zur DM1 ist die Lebenserwartung im Allgemeinen nicht deutlich eingeschränkt, selten kann aber ein plötzlicher Herztod eintreten [11, 22]. Der klinische Phänotyp der DM2 lässt sich wie folgt charakterisieren: Die Patienten werden initial durch eine proximale Muskelschwäche vor allem der unteren Extremitäten und eine Muskelatrophie auffällig (z. B. Schwäche beim Treppensteigen, M. iliopsoas-Parese), häufig klagen sie über unspezifische, aktionsinduzierte Muskelschmerzen (Myalgien). Die Gehfähigkeit ist, wenn auch teilweise stark eingeschränkt, meistens bis ins hohe Lebensalter erhalten. Die mimische Muskulatur ist, im Vergleich zur DM1, eher selten betroffen, die Muskelsteifigkeit klinisch zumeist relativ mild ausgeprägt, überwiegend in proximalen Muskeln. Multisystemische Symptome, wie eine subkapsuläre Katarakt, abnorme Tagesmüdigkeit, Fatigue, Konzentrationsstörungen, Erhöhung der Kreatinkinase oder γ -GT, endokrine Veränderungen (z. B. Diabetes mellitus, Hypothyreose, Hypogonadismus), Herzrhythmusstörungen (AV-Block, Brugada-Syndrom) und eine dilatative Kardiomyopathie, sind fakultative Symptome der Erkrankung [11, 12, 22, 23].



Proximal myotonic myopathy: A new dominant disorder with myotonia, muscle weakness, and cataracts

K. Ricker, MD; M.C. Koch, MD; F. Lehmann-Horn, MD; D. Pongratz, MD; M. Otto, PhD;
R. Heine; and R.T. Moxley III, MD

Article abstract—We describe three families with a dominantly inherited disorder. Affected individuals have myotonia, proximal muscle weakness, and cataracts. There was no abnormal CTG repeat expansion of the myotonic dystrophy (DM) gene in DNA from blood and muscle. The structure of the three families permitted linkage analysis, and there is no linkage to the gene loci for DM or to the loci for the muscle chloride channel disorders or muscle sodium channel disorders. The collection of symptoms in these three families seems to represent a new disorder.

NEUROLOGY 1994;44:1448-1452

Abb. 2 Kenneth Ricker (1935 - 2004), Erstbeschreibung der Myotonen Dystrophie Typ 2, 1994 [16]

II. Molekularpathogenese – Myotone Dystrophie, Typ 1 und Typ 2

Die Ätiopathogenese der Myotonen Dystrophien ist heterogen und bis zum heutigen Zeitpunkt nicht abschließend erforscht. Pathogenetisch liegt eine RNA-Prozessierungs- und Metabolisierungsstörung organspezifisch exprimierter Gene zugrunde (Abb. 3) [1, 8, 24, 25, 26]. Initial steht die Akkumulation expandierter, nicht kodierender RNAs im Zellkern im Zentrum, die sich wiederholende CUG-Elemente (DM1) bzw. CCUG-Elemente (DM2) enthalten. Bei der Myotonen Dystrophie Typ 1 sind die expandierten RNA-CUG-Repeats im 3'UTR des Dystrophia-Myotonica-Proteinkinase-Gens (DMPK-Gen) auf Chromosom 19q13.32 lokalisiert, die expandierten RNA-CCUG-Repeats bei der Myotonen Dystrophie Typ 2 im Intron 1 des ZNF9-Gens auf Chromosom 3q21.3. Diese Repeats bilden abnorme, haarnadelähnliche Doppelstrangstrukturen, mit Fehlpaarungen zwischen Uracil(U)-Nukleotiden und lagern sich in ribonukleären Foci im Zellkern und in geringerem Maße auch im Zytoplasma ab. Die CUG-Expansion bei der DM1 befindet sich in einem Exon und blockiert u. a. den regulären mRNA-Export aus dem Zellkern (Abb. 4) [27]. Die Folge ist eine Akkumulation der mRNA als Foci im Zellkern (Abb. 5) [27, 28]. Bei der DM2 hingegen liegt die CCUG-Expansion in einem Intron vor. Die mutierte ZNF9-prä-mRNA wird normal gespleißt, d. h. die Repeats (die Introns) werden herausgeschnitten, die prozessierte ZNF9-mRNA verliert ihre expandierten Intron-Repeats, und die mRNA (verknüpfte Exons) kann normal vom Kern exportiert werden. Die Intron-Repeats jedoch akkumulieren ebenfalls als Foci, weil der reguläre Abbauweg blockiert ist (Abb. 6, 7) [27]. Normalerweise werden Introns unmittelbar nach ihrer Exzision und Linearisation von Exosomen abgebaut. Die Aggregation von CCUG-Repeats in DM2-Zellkernen weist auf einen Block oder eine Hemmung des Abbaus des mutanten Introns 1 hin, d. h. CCUG-Repeats scheinen nicht mit Exosomen assoziiert zu sein [29].

Die expandierten CUG- bzw. CCUG-Repeats können Proteine des Zellkerns binden oder beeinflussen, wie z. B. die zwei RNA-Bindungsproteine CUG Bindungsprotein 1 (CUGBP1) und Muscleblind-like Protein 1 (MBNL1) [29]. Das CUGBP1 ist im Zellkern und im Zytoplasma exprimiert und spielt eine wichtige Rolle in vielen biologischen Prozessen. Es besitzt, wie auch MBNL1, Spleiß-Aktivität und erfüllt wichtige Funktionen im Zytoplasma, u. a. die Regulation der Protein-Translation und der RNA-Stabilität. Die Folge dieser Bindung ist eine CUGBP1-Überexpression bzw. MBNL1-Depletion. Eine Überexpression von CUGBP1 hat Veränderungen in Spleiß-Prozessen, Translation, RNA-Stabilität und Zielstrukturen zur Folge. CUGBP1 und MBNL1 regulieren das Spleißen derselben mRNA, binden allerdings an unterschiedlichen Stellen. Dies erklärt, warum die CUGBP1-Überexpression und die MBNL1-Depletion ähnliche Veränderungen bewirken [30, 31]. Durch die Dysregulation des CUGBP1 und MBNL1 wird das Spleißen verschiedener Gene strangabwärts behindert. Bei den gleichen Ziel-mRNAs handelt es sich unter anderem um die mRNA des Chloridkanals 1 (CLCN-1), des Insulinrezeptors und des kardialen Troponin T (cTNT) [30, 31]. Im regulären, alternativen Spleißvorgang findet das Herausschneiden der Introns aus der hnRNA statt, es werden unterschiedliche Exons ausgewählt und zusammengefügt, so dass aus einem Gen unterschiedliche Proteine entstehen, um die Anzahl der möglichen Genprodukte eines Gens zu erhöhen [32]. Das fehlerhafte Spleißen alternativer Exons mehrerer Gene führt zu veränderten Genprodukten mit Beibehaltung embryonaler Proteinisoformen und dem Resultat organspezifischer Zellfunktionsstörungen [33]. Die Folge sind multisystemische, organspezifische Auswirkungen, wie z. B. eine Myotonie (für den Chloridkanal), eine Insulinrezeptorresistenz (für den Insulinrezeptor) oder eine kardiale Beteiligung (z. B. für das cTNT).

Eine wichtige Frage in dieser RNA-Prozessierungsstörung ist, inwieweit die Größe der CUG- bzw. CCUG-Repeats mit dem Ausmaß des fehlgesteuerten Spleißens korreliert. Untersuchungen mit Mausmodellen haben gezeigt, dass eine große Anzahl kurzer CCUG-Repeat-Kopien dieselbe Toxizität besitzt wie eine niedrigere Anzahl längerer CCUG-Repeat-Kopien [34]. Bei den CUG-Repeat-Kopien wird angenommen, dass kürzere CUG-Expansionen in einer hohen

Anzahl sogar größere Spleißabnormalitäten generieren, d. h. toxischer sein können, als längere Expansions [35]. Durch die Bindung der CUG-/CCUG-Repeats an CUGBP1 entstehen Komplexe, die das CUGBP1 stabilisieren. Man spricht auch von CUGBP1-gebundener, hochmolekularer Makrokomplexbildung [26, 34]. Neben der Erhöhung des CUGBP1 lässt sich auch eine gleichzeitige Erhöhung von phosphorylierten Isoformen des CUGBP1 nachweisen, die die Stabilität zusätzlich erhöhen. In diesem Zusammenhang wurde beobachtet, dass bei der DM2 auch die Aktivität des 20-S-Proteasoms durch die stabilisierende Bindung von CCUG-Repeats reduziert wird [34]. Das Proteasom ist eine ATP-abhängige Protease und kommt sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern vor. Seine Funktion ist der Abbau von Proteinen, die in der Zelle nicht mehr gebraucht werden, z. B. regulatorische Proteine, falsch gefaltete Proteine und nicht funktionsfähige Proteine. Es besteht aus zwei regulatorischen 19-S-Cap-Komplexen und einem zentralen katalytischen 20-S-Kernkomplex. Zusammen bilden diese Komplexe das 26-S-Proteasom, das für Eukaryonten charakteristisch ist [32]. Durch die akkumulierten CCUG-Repeats wird dieser Regulationsmechanismus beeinträchtigt. In gesunden Zellen sind keine derartigen Komplexe nachweisbar [34].

In der normalen Myogenese wird die CUGBP1-Funktion durch die spezifische Phosphorylierung durch die Akt Kinase (Ser28) und Cyclin D3/Cyclin D4 (Ser304) reguliert. Bei der DM1 kommt es zu einer veränderten Phosphorylierung des CUGBP1. Dies führt zu einer Zunahme von Cyclin D1 in den Myoblasten und einer Abnahme von p21 in den Myotuben. Die Folge ist eine Differenzierungsstörung in der Myogenese, da Cyclin D1 regulatorische Funktionen im Rahmen der Zellproliferation besitzt und p21 eine wichtige Rolle bei der Zelldifferenzierung der Myoblasten spielt [36, 37]. Bei der DM2 wird das ZNF9-Protein, ein Transkriptionsfaktor, durch die CCUG-Repeats folgenreich beeinflusst. Es bindet an die 5'UTRs der Terminal oligopyrimidine tract (TOP)-mRNAs, die Proteine des Translationsapparates (z. B. Human ribosomal protein, RPS17, poly(A)-binding protein, PABP, Elongationsfaktoren, eEF1A, eEF2) kodieren [38]. Dadurch ist es an der Regulation der cap-abhängigen und cap-unabhängigen Translation beteiligt. Bei DM2-Patienten ist die Bindungsaktivität des ZNF9-Proteins an die 5'UTRs der TOP-mRNAs signifikant reduziert. Die Folge ist eine Reduktion der globalen Proteinsyntheserate in DM2-Muskelzellen, die die Schlussfolgerung zulässt, dass eine Hemmung des ZNF9-Proteins u. a. Hauptsymptome der DM2 verursachen kann [29].

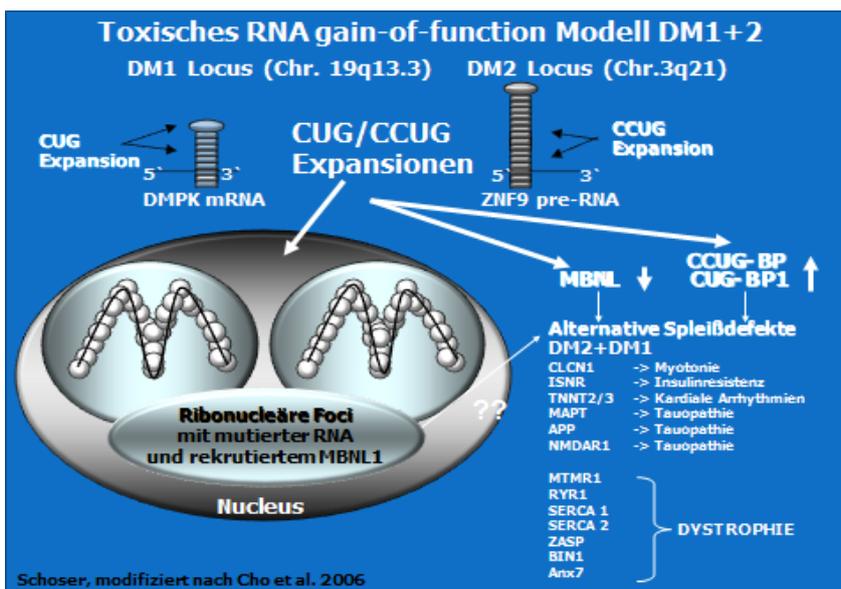


Abb. 3 Modellvorstellung zur toxischen „gain-of-function“-RNA-Pathogenese, Spleißopathie und Änderung des RNA-Metabolismus; Mechanismus im Skelettmuskel, Gehirn, Herz und Leber/Pankreas (Insulinresistenz) [Schoaser, modifiziert nach 11].

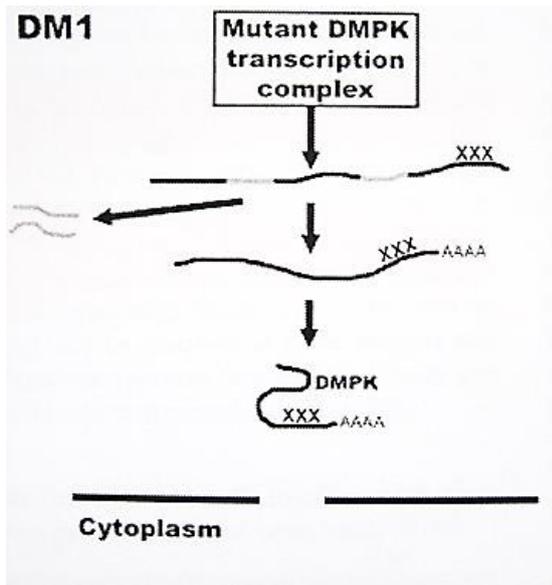


Abb. 4 mRNA-Export-Signalweg bei der DM1 [27].

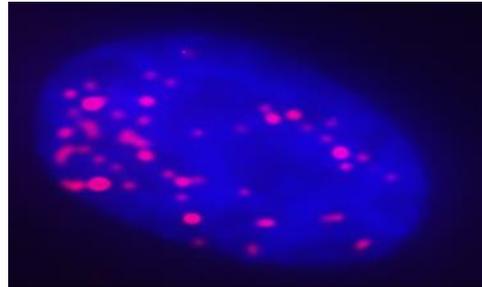


Abb. 5 CUG-Repeat-Akkumulation im Zellkern bei der DM1 (ribonukleäre Foci) [28].

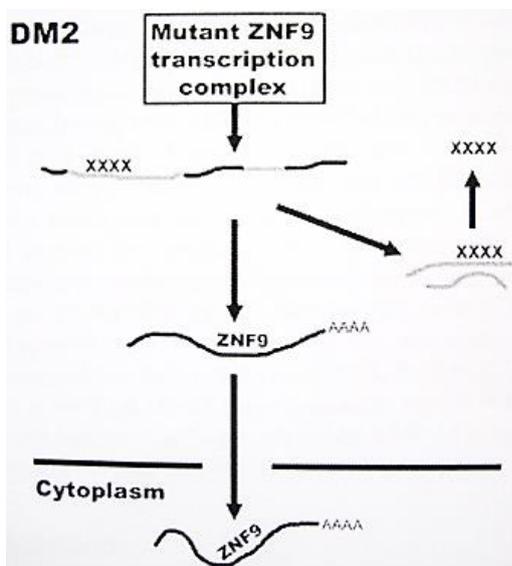


Abb. 6 mRNA-Export-Signalweg bei der DM2 [27].

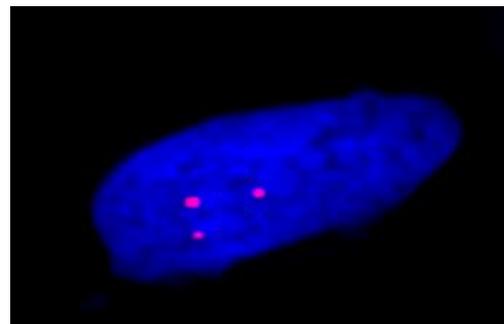


Abb. 7 CCUG-Repeat-Akkumulation im Zellkern bei der DM2 (ribonukleäre Foci).

III. Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Arbeit ist eine Phänotyp-Genotyp-Beschreibung von klinisch als DM2-Patienten charakterisierten Personen, die in der normalen molekulargenetischen DM2-Routinediagnostik nicht als DM2-Patienten klassifiziert wurden. Mit Hilfe einer erweiterten molekulargenetischen Analyse konnte ein kurzes DM2-Repeat nachgewiesen werden und konsekutiv die Evaluation der Pathogenität kurzer Repeats u. a. in den Muskelbiopsaten dieser Patienten erfolgen.

Die insgesamt elf in die Untersuchung eingeschlossenen Patienten sind DM2-Patienten des Friedrich-Baur-Instituts in München. Diese Patienten fielen durch Symptome auf, die mit denen der Myotonen Dystrophie Typ 2 übereinstimmen. In genetischen Untersuchungen wurde das für eine DM2 zunächst typische große Risikoallel nachgewiesen, allerdings lag die geschätzte CCTG-Repeat-Größe unter der bisher als diagnostisch pathologisch festgesetzten Größe von 75 CCTG-Repeats [9]. Somit konnte die Diagnose einer Myotonen Dystrophie Typ 2 zunächst weder eindeutig bestätigt, noch definitiv molekulargenetisch ausgeschlossen werden.

An dieser Stelle setzt die zentrale Fragestellung dieser Arbeit an: Ist es möglich, dass bereits CCTG-Expansionsen, kürzer als 75 CCTG-Repeats, pathogenetisch relevant sind? Oder anders formuliert, wie lang muss das CCTG-Repeat sein, so dass es für eine DM2 ursächlich in Bezug auf die klinische Symptomatik sein kann?

Mithilfe einer detaillierten Erfassung des Phänotyps dieser elf Patienten, sowie verschiedener histologischer und molekulargenetischer Nachweismethoden, wie z. B. der Immunhistologie, der Fluoreszenz in situ Hybridisierung und der Sequenzierung des betroffenen Genabschnitts, soll diese Frage beantwortet werden. Ergänzend wurde zur Bestätigung der Repeat-Nachweis im Muskel und ein Splicing assay des muskulären Chloridkanals 1 durchgeführt.

IV. Phänotyp-Beschreibung

Eine Zusammenfassung des Phänotyps der elf Patienten im Hinblick auf Symptome der Myotonen Dystrophie Typ 2 lässt folgende charakteristische und diagnostisch relevante Symptome beschreiben: Das durchschnittliche Alter bei Erkrankungsbeginn lag zwischen dem 40. und 70. Lebensjahr, im Mittel um das 58. Lebensjahr ($STD \pm 15,06$). Ein Patient war schon als Kind aufgrund von Problemen beim Treppensteigen und beim Laufen auffällig gewesen und vom Schulsport suspendiert worden. Die Familienanamnese ist in fünf von elf Fällen für einen autosomal dominanten Erbgang positiv, darunter befinden sich zwei Brüder, Patient Nr. 2 und Patient Nr. 11 (siehe Tabelle 1; Abb. 8).

Patientennummer	Geschlecht	Alter	Erkrankungsalter	Familienanamnese
1	m	52	45	positiv Tochter: HyperCKämie und belastungsabhängige Myalgien.
2	m	61	56	positiv älterer Bruder (Pat.-Nr. 11)
3	m	68	52	positiv Mutter: Katarakt, Diabetes mellitus Vater: Muskelsteifigkeit, Katarakt und Myokardinfarkt.
4	w	81	73	unauffällig
5	m	76 †	70	unauffällig
6	w	66	50	positiv Mutter: Muskelschwäche, Katarakt, Diabetes mellitus und Herzrhythmusstörungen Tante (mütterlicherseits): Katarakt Nichte (mütterlicherseits): proximale Muskelschwäche.
7	m	53	47	unauffällig
8	w	92 †	78	unauffällig
9	m	60	54	unauffällig
10	m	34	21	unbekannt
11	m	69	63	positiv : jüngerer Bruder (Pat.-Nr. 2)

Tabelle 1 Biographische Daten



Abb. 8 Pat.-Nr. 11 (links: älterer Bruder) und Pat.-Nr. 2 (rechts: jüngerer Bruder); genehmigte Abbildung mit schriftlichem Einverständnis der abgebildeten Personen (siehe Appendix; 10.3).

1. Proximale Myalgien

Klinisch im Vordergrund stehen belastungsinduzierte, nozizeptive, multilokuläre Muskelschmerzen (n=7; Pat.-Nr. 1, 2, 3, 5, 7, 8, 10; Tabelle 2, Abb. 9). Betroffen sind v. a. die Oberarmmuskulatur, die lumbale Rückenmuskulatur, das Gesäß, sowie die Oberschenkel- und geringer die Wadenmuskulatur beidseits (proximale Myalgien).

2. Proximal betonte Paresen

Auch eine chronisch progrediente Schwäche der proximalen Muskulatur mit Betonung des Schulter- und Beckengürtels und der Fußheber ist auffällig (n=9; Pat.-Nr. 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 11; Tabelle 2, Abb. 9). Die Nackenbeuger, darunter v. a. der M. sternocleidomastoideus, können ebenfalls betroffen sein (n=5; Pat.-Nr. 2, 3, 4, 5, 6). Im Verlauf tritt meist eine Schwäche der Schulter- und Armheber hinzu (n=4; Pat.-Nr. 4, 5, 6, 9), die u. a. das Arbeiten über Kopf, sowie die Pro- und Supination stark einschränken (n=2; Pat.-Nr. 1, 8). Ein Kraftverlust in den Händen fällt durch eine Verschlechterung des Faustschlusses, v. a. der Arbeitshand (rechtsbetont), auf. Hier zeigen sich Paresen der Daumenextensoren (n=3; Pat.-Nr. 2, 3, 11).

3. Myotonie

Intermittierende Verkrampfungs- und Steifigkeitsgefühle in den Händen, wie z. B. das erschwerte Handöffnen nach Faustschluss (Greifmyotonie), werden von fünf Patienten beschrieben (Pat.-Nr. 1, 2, 3, 8, 9). Ein Patient berichtet von einer Zunahme der Beschwerden bei Kälte (Pat.-Nr. 1). Perkussionsmyotonien an der Ober- und Unterarmmuskulatur zeigen sich bei einem Patienten (Pat.-Nr. 7). Ein sog. Lid lag, das erschwerte und verzögerte Augenöffnen nach Lidschluss, wird nicht beschrieben, ebenso keine Zungenmuskulatur-Myotonie. Durch eine proximale Steifigkeit der Beinmuskulatur resultiert im Alltag eine schweregradabhängige Beeinträchtigung der Gehfähigkeit (n=10; Pat.-Nr. 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 11). Von einem unsicheren Gang mit Gehstock oder Rollator und gelegentlichem bis häufigem Stolpern, sowie nächtlichen Stürzen wird berichtet (n=3; Pat.-Nr. 3, 8, 9).

4. Dysphagie

Von drei Patienten werden Schluckbeschwerden angegeben, allerdings variiert die Ausprägung von seltenem Verschlucken bis hin zu Schluckbeschwerden für feste Speisen (Pat.-Nr. 2, 4, 8). Inwieweit es sich um eine myotone Dysphagie des oberen Ösophagusanteils handelt ist unklar.

5. Dyspnoe

Bezüglich einer Dyspnoe besteht ebenfalls eine Variationsbreite von Atemnot nur bei körperlicher Belastung bis hin zu Atemnot bereits bei geringer körperlicher Belastung (n=2; Pat.-Nr. 1, 2). Auch hier kann ggf. eine Myotonie der Atemhilfsmuskulatur oder des Diaphragmas vorliegen.

6. Tagesmüdigkeit – Fatigue

Begleitend findet sich bei vier Patienten (Pat.-Nr. 2, 3, 4, 9) eine deutlich vermehrte Müdigkeit mit verkürzter Einschlafzeit, imperativem Schlafdrang und allgemeiner Erschöpfung und Abgeschlagenheit, v. a. tagsüber.

7. Weitere multisystemische Symptome

Die bei der Myotonen Dystrophie Typ 2 beschriebenen nicht neuromuskulären Manifestationen können auch bei den elf untersuchten Patienten in unterschiedlichem Ausmaß nachgewie-

sen werden (siehe Tabelle 2). Fünf Patienten (Pat.-Nr. 3, 4, 5, 6, 8) sind an einer Katarakt erkrankt, die zwischen dem 35. und 70. Lebensjahr auftrat und auch Familienangehörige ersten Grades betrifft. Ein mitunter schwer einstellbarer Diabetes mellitus wurde bei zwei Patienten (Pat.-Nr. 2, 3) diagnostiziert. Auch von einer kardialen Beteiligung sind sechs Patienten betroffen (Pat.-Nr. 1, 3, 5, 8, 9, 11; Z. n. Myokardinfarkt, Sick-Sinus-Syndrom, intermittierende Tachyarrhythmia absoluta, koronare Gefäßerkrankung, Herzinsuffizienz); eine Schilddrüsenfunktionsstörung (Struma, Hashimoto Thyreoiditis) ist bei fünf Patienten (Pat.-Nr. 2, 3, 5, 6, 9) zu vermerken. Laborchemisch konnten phasenhaft, wie auch kontinuierlich (bis zu 1½ Jahre), gering bis stark erhöhte Kreatinkinasewerte zwischen 1000 U/l und 10.000 U/l gemessen werden (n=8; Pat.-Nr. 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 10). Bei sieben Patienten (Pat.-Nr. 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10) ist eine Erhöhung der Leberwerte, v. a. der γ -GT, aber auch der Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT) und der Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (GOT) auffällig.

	Myalgien	Proximal betonte Schwäche	Atrophie	CK-Erhöhung	Katarakt	Diabetes mellitus	Müdigkeit	Leberwert-erhöhung	Kardiale Beteiligung	Schilddrüsenfunktions-störung
Patient 1	x	x	x	x					x	
Patient 2	x	x	x	x		x	x	x		x
Patient 3	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Patient 4		x	x	x	x		x	x		
Patient 5	x	x	x	x	x			x	x	x
Patient 6		x	x	x	x			x		x
Patient 7	x		x	x						
Patient 8	x	x	x		x			x	x	
Patient 9		x					x		x	x
Patient 10	x			x				x		
Patient 11		x							x	
	7	9	8	8	5	2	4	7	6	5

Tabelle 2 klinische Synopsis

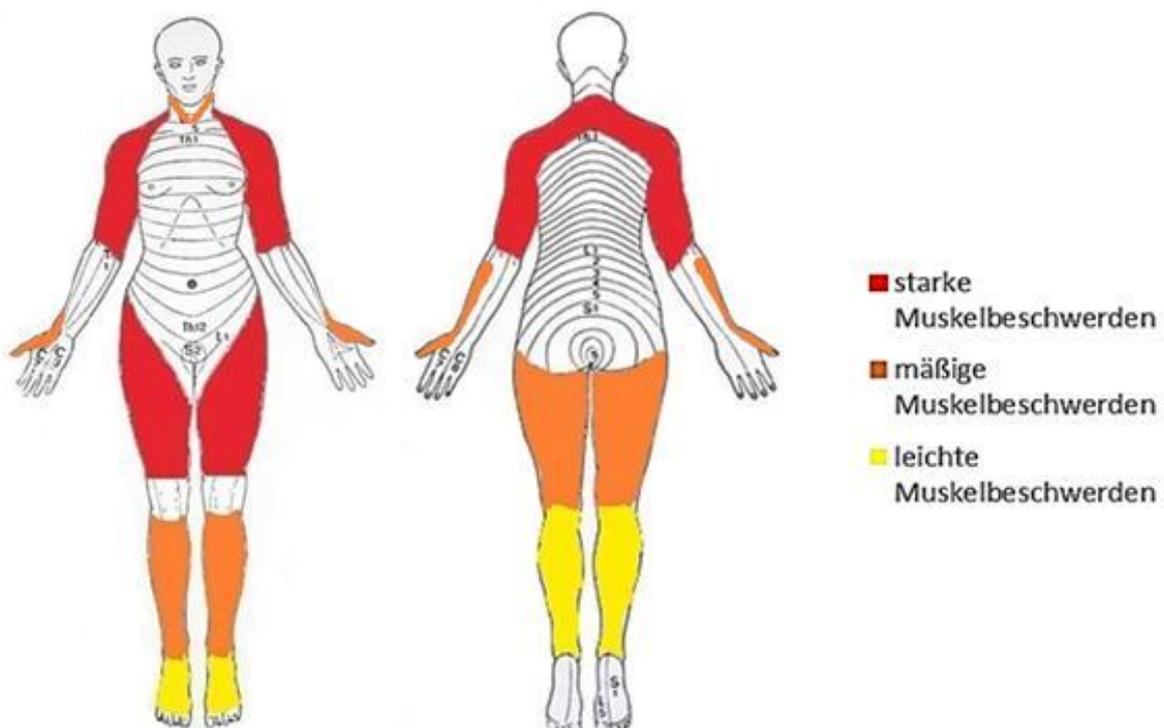


Abb. 9 Verteilungsmuster der muskulären Symptome wie Muskelschwäche, Muskelatrophie, Myalgien und Myotonie [39].

Klinisch-neurologischer Status

Psychopathologischer Befund

Ein Patient (Pat.-Nr. 3) entwickelte im Laufe seiner Erkrankung eine reaktive Depression, sowie phobische Züge im Sinne einer Agoraphobie. Der psychopathologische Befund bei den anderen Patienten war zu allen Untersuchungszeitpunkten unauffällig. Eine ausführliche neuropsychologische Testung wurde nicht durchgeführt.

Hirnnervenstatus

Im Bereich der Kopf- und Hirnnerven ist bei fünf Patienten eine Katarakt-Erkrankung zu erwähnen (Pat.-Nr. 3, 4, 5, 6, 8), bei zwei Patienten anamnestisch eine geringe Hörschwäche (Pat.-Nr. 6, 9). Eine leichte bifaziale Schwäche findet sich bei zwei Patienten (Pat.-Nr. 4, 9), eine Geschmacksminderung bei einem Patienten (Pat.-Nr. 8). Eine Dysphagie besteht bei drei Patienten (Pat.-Nr. 2, 4, 8). Bei fünf Patienten (Pat.-Nr. 2, 3, 4, 5, 6) zeigt sich eine geringe Parese des M. sternocleidomastoideus ein- bzw. beidseits (Kraftgrad MRC-Skala: 4/5). Der übrige Hirnnervenstatus ist unauffällig.

Manuelle Kraftprüfung

In der manuellen Kraftprüfung nach der 5-Punkte-MRC-Skala erkennbare Kraftabnahme im Bereich des M. deltoideus bds. mit einem Kraftgrad (KG) von 4/5 (n=4; Pat.-Nr. 4, 5, 6, 9), M. biceps brachii bds. KG 4/5 (n=3; Pat.-Nr. 5, 6, 8), M. brachioradialis bds. KG 4/5 (n=2; Pat.-Nr. 1, 8) und M. triceps brachii bds. KG 4/5 (n=1; Pat.-Nr. 5). Handbeuger- und Handstreckerparesen mit einem KG 4/5 (n=1; Pat.-Nr. 8), Daumenextensorenparesen KG 4/5 (n=3; Pat.-Nr. 2, 3, 11), Fingerstreckerparesen KG 4/5 (n=1; Pat.-Nr. 9) und in einem Fall (Pat.-Nr. 8) Plegie der proximalen Interphalangealgelenke (PIP) und der distalen Interphalangealgelenke (DIP). An der unteren Extremität finden sich Paresen der Hüftbeuger (M. iliopsoas) mit Kraftgraden zwischen 3/5 und 4/5 (n=7; Pat.-Nr. 2, 3, 4, 6, 8, 9, 11), der ischiocruralen Muskulatur (M. biceps femoris, M. semimembranosus, M. semitendinosus) KG 4-5/5 (n=1; Pat.-Nr. 4), der Kniestrecker (M. quadriceps femoris) mit Kraftgraden von 2/5 bis 4/5 (n=4; Pat.-Nr. 3, 4, 6, 8), der Fußheber (M. tibialis anterior) mit Kraftgraden von 2/5 bis 4/5 (n=5; Pat.-Nr. 3, 6, 7, 8, 9) und der Fußsenker (M. gastrocnemius) KG 4/5 (n=1; Pat.-Nr. 3). Die Rumpfmuskulatur ist bei zwei Patienten (Pat.-Nr. 1, 5), mit einem Kraftgrad von 3/5 bzw. 4/5, auffällig. Eine Nackenbeugerparese (M. sternocleidomastoideus) mit einem KG 4/5, liegt bei fünf Patienten (Pat.-Nr. 2, 3, 4, 5, 6) vor, die Nackenstrecker sind vollkräftig.

Muskelatrophien

Bei acht von elf Patienten (Pat.-Nr. 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8) bestehen Atrophien der Muskulatur. Diese betreffen die Schultergürtel- und die Oberarmmuskulatur (M. deltoideus, M. biceps brachii; n=3; Pat.-Nr. 2, 5, 7), die Unterarmmuskulatur (Extensoren; n=2; Pat.-Nr. 6, 8), die Oberschenkel (M. quadriceps femoris; n=3; Pat.-Nr. 4, 7, 8), die Unterschenkel (M. gastrocnemius; n=2; Pat.-Nr. 1, 2) und die Muskulatur der Fußheber (M. tibialis anterior; n=3; Pat.-Nr. 3, 6, 7). Vor allem Probleme beim Treppensteigen, bis hin zur Unfähigkeit Treppen zu steigen, sind bei sieben von elf Patienten vorhanden (M. iliopsoas-Parese), s. o. „Manuelle Kraftprüfung“. Auch ein Aufstehen aus dem Sitzen und speziell aus der Hocke ist mit zunehmender Symptomatik nur noch erschwert möglich bzw. unmöglich (n=3; Pat.-Nr. 2, 8, 9). Im fortgeschrittenen Stadium ist ein Aufrichten ohne Hilfestellung aus dem Liegen oder aus dem Sitzen nicht mehr möglich (n=2; Pat.-Nr. 8, 9).

Stand- und Gangprüfungen

Der Zehen- und Fersengang ist nur erschwert bis nicht durchführbar (n=3; Pat.-Nr. 3, 6, 8), das Einbeinhüpfen ist nur unsicher durchführbar, ebenso ist der Strichgang unsicher (n=3; Pat.-Nr. 1, 3, 8). Der Romberg-Versuch ist positiv, im Sinne einer sensiblen Ataxie (n=1; Pat.-Nr. 3). Die Extrapiramidalmotorik ist bei allen Patienten unauffällig.

Sensibilität

Die Sensibilität für alle Modalitäten ist bei fünf Patienten (Pat.-Nr. 1, 2, 3, 4, 8) in Form einer strumpfförmigen, distal-symmetrischen Hypästhesie an der unteren Extremität eingeschränkt. Die Berührungsempfindlichkeit der Hände ist reduziert, u. a. durch Kribbelparästhesien (n=2; Pat.-Nr. 1, 3). Das Vibrationsempfinden an den Malleolen und den Handgelenken ist teilweise reduziert auf Grade zwischen 0/8 und 6/8 bei vier von elf Patienten (Pat.-Nr. 1, 3, 4, 8), darunter ein Patient (Pat.-Nr. 3) mit einem insulinpflichtigen Diabetes mellitus seit 1992.

Muskeldehnungsreflexe

Die Muskeldehnungsreflexe sind an der oberen Extremität mittlebhaft bis abgeschwächt, an der unteren Extremität ist der Quadriceps-Reflex abgeschwächt bis nicht auslösbar (n=4; Pat.-Nr. 1, 3, 6, 8) und der Triceps-surae-Reflex stark abgeschwächt bis nicht auslösbar (n=5; Pat.-Nr. 1, 3, 4, 6, 8), darunter Patient Nr. 3 mit einem Diabetes mellitus. Pathologische Reflexe, Kloni oder eine Verbreiterung der Reflexzonen sind nicht nachweisbar.

Paraklinische Untersuchungen

Elektromyographie

Nadel-Elektromyographisch wurden bei allen zehn der elf Patienten, die am stärksten betroffenen Muskeln, M. deltoideus, M. biceps brachii, M. quadriceps femoris, M. vastus medialis und M. tibialis anterior untersucht. Bei acht Patienten (Pat.-Nr. 2, 3, 5, 6, 7, 8, 10, 11) zeigt sich eine teilweise floride Spontanaktivität in Form von positiven scharfen Wellen und Fibrillationen im M. biceps brachii, M. vastus lateralis und im M. tibialis anterior. Bei zwei Patienten (Pat.-Nr. 1, 4) ist keine pathologische Spontanaktivität nachweisbar. Bei Willkürinnervation sind kurze, komplexrepetitive, niedrigamplitudige Potentiale mit erhöhter Polyphasierate messbar. Bei zwei Patienten (Pat.-Nr. 4, 8) sind die Potentiale der motorischen Einheiten teilweise neurogen verbreitert und überhöht nachweisbar. Eindeutig myotone Serienentladungen zeigen sich bei vier Patienten (Pat.-Nr. 1, 2, 3, 5) in folgenden Muskeln: M. interosus dorsalis I, Thenar, M. tibialis anterior, M. gastrocnemius.

Neurographie

Ein Großteil der Patienten wurde auch elektrophysiologisch untersucht (n=8; Pat.-Nr. 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 10). Die Nervenleitgeschwindigkeiten und die distale motorische Latenz liegen bei sechs Patienten im Normbereich (Pat.-Nr. 1, 2, 4, 6, 7, 10). Bei einem Patienten (Pat.-Nr. 8) ist die Nervenleitgeschwindigkeit, sowohl motorisch als auch sensibel, leicht reduziert (N. peroneus, N. tibialis, N. suralis). Ebenfalls bei nur einem Patienten ist eine hochgradige Reduzierung der Amplituden der Muskelantwortpotentiale aller Nerven messbar und eine mäßige Reduzierung der Leitgeschwindigkeiten mit einer verlängerten distalen motorischen Latenz. Dies ist vereinbar mit einer ausgeprägten sensomotorischen Polyneuropathie, vorwiegend vom axonalen Typ, bei einem langjährigen insulinpflichtigen Diabetes mellitus (Pat.-Nr. 3).

Myosonographie

Myosonographisch zeigt sich bei zwei (Pat.-Nr. 3, 6) von drei untersuchten Patienten (Pat.-Nr. 2, 3, 6) eine Inhomogenität im Echosignal des M. tibialis anterior mit verstärkter Fiederung der Muskulatur bei erhaltenem Knochenschallsignal. Bei einem Patienten (Pat.-Nr. 3) ist ein identischer Befund auch im M. vastus lateralis nachweisbar. Im M-Mode kein Nachweis von Faszikulationen in den tiefen Muskelschichten.

Muskel-MRT

Bei fünf Patienten (Pat.-Nr. 1, 4, 5, 7, 8) liegen MRT-Aufnahmen der Muskulatur vor. Vier Patienten (Pat.-Nr. 4, 5, 7, 8) zeigen im Bereich der Oberschenkel flächige Signalhyperintensitäten. Vereinbar sind diese mit einer teilweise ausgeprägten fettigen Degeneration der Adduktoren- und Extensorengruppen (Abb. 10). Auch an den Unterschenkeln sind ödematöse/lipomatöse Veränderungen mit schwacher bis fleckiger Kontrastmittelaufnahme erkennbar (Abb. 11).

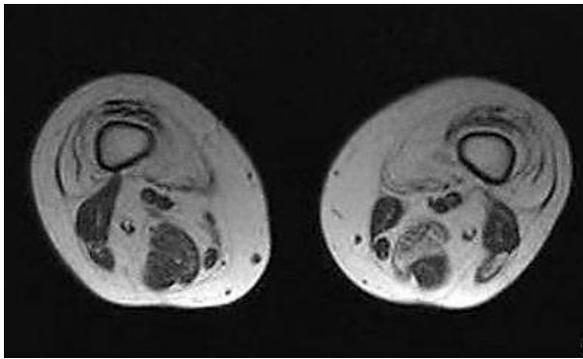


Abb. 10 MRT der Oberschenkel Pat.-Nr. 8

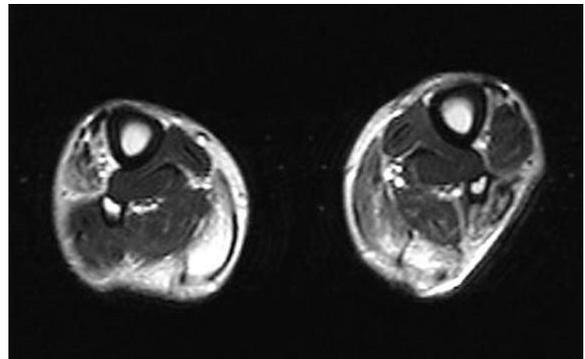


Abb. 11 MRT der Unterschenkel Pat.-Nr. 7

V. Material und Methoden

Material

Die differentialdiagnostisch gewonnenen und vorliegenden Muskelbiopate von acht der elf Patienten wurden untersucht. Vorbefundlich hatten sich morphologisch in den Muskelzellen zentrale Kerne und eine Typ 2-Faseratrophie gezeigt. Kontrollen waren fünf Personen ohne pathologischen Befund und fünf Kontrollen mit anderen, im Institut genetisch gesicherten Muskelerkrankungen, wie die Becker Muskeldystrophie (BMD), die okulopharyngeale Muskeldystrophie (OPMD), das mitochondriale Depletionssyndrom, die Duchenne Muskeldystrophie (DMD) und die inclusion body myopathy associated with Paget disease of the bone and frontotemporal dementia (IBMPFD) mit Mutationen im Valosin-Containing-Protein-Gen (VCP-Gen).

5.1 Immunhistochemie

Mit Hilfe der Immunhistochemie sollten die CCUG-Repeat-Expansionen nachgewiesen werden. Dies erfolgte mittels Immunfluoreszenz unter Verwendung von monoklonalen Antikörpern gegen die Muscleblind-like Proteine MBNL1, MBNL2, MBNL3 und das CUG Bindungsprotein 1, CUGBP1. Zunächst erfolgte zur Standardisierung eine Versuchsreihe mit genetisch gesicherten DM2-Patienten mit einem „typisch“ expandierten Repeat (> 75 CCTGs), im Anschluss daran wurde die Untersuchung auch bei den DM2-Patienten mit kurzem DM2-Repeat durchgeführt. Grundlage dieses Verfahrens war die von Holt beschriebene Methodik [40].

Primäre Antikörper und histochemische Methoden

Als primäre Antikörper wurden CUGBP1 (rabbit-polyclonal-purified) in der Verdünnung 1:25 (Geschenk von Prof. Timchenko, Houston, Texas, USA) und Mb1a, Mb1b, Mb2a, Mb3a (Geschenk von Ian Holt, Wolfson Centre for Inherited Neuromuscular Disease, Oswestry, SY10 7AG, UK) verwendet. Als sekundäre Antikörper dienten Alexa Flour 488 goat-anti-rabbit Invitrogen A11034 Lot. 45558A und Alexa Flour 594 goat anti-mouse A11005 Lot. 561779. Die Fixierung erfolgte in Aceton. Die Blockingsolution enthielt 1 %iges horse serum, 1 %iges fetal bovine serum (FBS), 0,1 %iges bovine serum albumin (BSA) ad 50 ml phosphate buffered saline (PBS) 7,9 mmol/l, pH 7,4. Die Kernfärbung erfolgte mit 4',6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI) 5 mg/ml. Eingedeckt wurde mit Kaiser´s-Glycerin-Gelatine.

Methodik im Detail

Von den Muskelbiopaten der Patienten existierten bei sechs Patienten asservierte Kryostatanschnitte von ca. 8 µm Dicke, ca. vier Muskelschnitte pro Objektträger. Bei den Objektträgern handelte es sich um Superfrost-Objektträger. Die Schnitte waren bei -80 °C tiefgefroren, und wurden vor der ersten Färbung bei -20 °C gelagert. Bei zwei Patienten mussten, von noch vorhandenem Muskelgewebe, Kryostat-Muskelschnitte angefertigt werden. Am ersten Färbungstag wurden die Schnitte und Kontrollen für mindestens 10 min bei Raumtemperatur getrocknet und anschließend für 10 min in Aceton fixiert. Allgemein fanden alle Inkubationen bei Raumtemperatur statt und wurden mit Blockingsolution angesetzt. Die Vorinkubation wurde ebenfalls mit Blockingsolution angesetzt, für ca. 30 min bei Raumtemperatur. In der Zwischenzeit, wurde der primäre Antikörper CUGBP1 rabbit-polyclonal-purified in der Verdünnung 1:25 hergestellt und mit einem 0,45 µm-Filter filtriert. Pro Objektträger wurden ca. 50 - 60 µl Antikörper aufgetragen. Die Inkubation fand über Nacht statt. Am zweiten Färbungstag wurden die Schnitte für 10 min in PBS gewaschen und der sekundäre Antikörper

Alexa-Fluor 488 goat-anti-rabbit in der Verdünnung 1:300 hergestellt. Pro Objektträger wurden ca. 50 - 60 µl Antikörper aufgetragen und, fortan unter Lichtschutz, für 1 h inkubiert. Die Schnitte wurden erneut 10 min in PBS gewaschen, die Antikörper Mb1a, Mb1b, Mb2a und Mb3a in der Verdünnung 1:10 hergestellt und jeweils 50 - 60 µl pro Objektträger aufgetragen. Die vier Antikörper pro Patient wurden jeweils 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte 10 min Waschen in PBS, währenddessen Herstellung des sekundären Antikörpers Alexa 594 goat anti-mouse in der Verdünnung 1:2000. Pro Objektträger 50 - 60 µl, Inkubation für 1 h bei Raumtemperatur, dann 10 min Waschen in PBS. Daran schloss sich, für 3 min, die Kernfärbung mit DAPI, in der Verdünnung 1:60.000 in den Waschküvetten an. Es folgte 10 min Waschen in PBS und im Anschluss das Eindecken mit Kaiser's-Glycerin-Gelatine. Die Schnitte wurden bei 4 °C gelagert und am nächsten Tag unter dem Fluoreszenzmikroskop begutachtet.

5.2 Fluoreszenz in situ Hybridisierung

Material

Als Ergänzung der Immunhistochemie und zur weiteren Spezifizierung wurde an den Muskelbiopaten der acht Patienten die Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH) durchgeführt. Als Grundlage dieses Verfahrens diente die von Meola beschriebene Methodik [41]. Das Ziel ist der präzise Nachweis von ribonukleären Einschlüssen in den Muskelzellen und Muskelzellkernen, die die CCTG-Expansion enthalten. Zusätzlich wurden die Muskelpräparate von zwei genetisch gesicherten DM2-Patienten mit einem „typisch“ expandierten Repeat (> 75 CCTGs) mitgefärbt. Kontrollen waren die Muskelbiopate von drei Probanden ohne pathologischen Befund. Die Muskelbiopate der Patienten waren Schnitte von ca. 8 µm Dicke, ca. vier Muskelschnitte pro Objektträger (Superfrost-Objektträger).

Methoden

Die bei -20 °C gelagerten Schnitte und Normalkontrollen wurden für 10 min bei Raumtemperatur luftgetrocknet und in 2 %igem Paraformaldehyd bei 4 °C für 30 min fixiert. Es folgte ein fünfmaliger Waschgang in PBS für 3 min bei Raumtemperatur und im Anschluss die Permeabilisierung in 2 %igem Aceton-PBS (vorgekühlt auf Eis) für 5 min. Nach einem erneuten Waschen in PBS für 10 min wurde die Inkubation in 30 %igem Formamid, 2 x Saline-sodiumcitrate buffer (SSC) und 1,5 µl yeast tRNA pro ml Inkubationsansatz für 10 min bei Raumtemperatur angesetzt. Währenddessen wurde ein Hybridisierungs-Mix aus 30 %igem Formamid, 2 x SSC, 0,02 %igem BSA, 2,97 µl yeast tRNA pro µl Hybridisierungs-Mix (SIGMA R-6625 100 g, Typ VI, Torula Yeast; 90 mg/ml hergestellte yeast tRNA Stocklösung) hergestellt und, pro µl Sonde-RNasin-Gemisch, 0,23 µl ZNF9-Oligo-TR: 5'Texas Red-CAG GCA GGC AGG CAG GCA GG-3' und 0,05 µl RNasin (PROMEGA RNasin plus RNase Inhibitor Catalog#N2611; System Lot#165840) ad aqua dest gegeben. Das Verhältnis von Hybridisierungs-Mix zu Sonde-RNasin-Gemisch betrug 1:1. Pro Objektträger etwa 60 µl, Inkubation für 2 h bei 37 °C. Die Objektträger wurden erst in 30 %igem Formamid, dann mit 2 x SSC bei 45 °C für 30 min gewaschen und im Anschluss mit 1 x SSC für 3 min bei Raumtemperatur. Es folgte das Eindecken mit Vectashield Mounting Medium mit DAPI und Lagern der Schnitte bei 4 °C. Die Muskelschnitte wurden am nächsten Tag unter dem Fluoreszenzmikroskop begutachtet.

5.3 Triplet-Repeat-Primed PCR

Zur genaueren Analyse der Größe der Allele wurde eine Triplet-Repeat-Primed PCR (TP-PCR) angeschlossen. Diese Methode entwickelte Warner et al. 1996 als Screeningmethode für expandierte Allele bei der Myotonen Dystrophie [42]. In dieser Methode spielen drei Primer eine Rolle. Zwei genspezifische Primer, die die Repeat-Region flankieren und ein dritter Primer, der komplementär zum Repeat ist [43].

Angesetzt wurde ein Mastermix mit 23 µl Puffer A, 0,045 mmol/l MgCl₂, 1 µl Primer F, 1 µl Primer R, 1 µl MRC-Holl.-Rev. (Verstärker), 2 µl Dimethylsulfoxid (DMSO), 0,4 µl 1:16 P/T (640 µl Puffer D, 60 µl Pfu, 100 µl Taq. P). Für n Reaktionen wurde der Mastermix (n+1)-mal angesetzt. Von diesem Mastermix wurden für jede Probe 26,5 µl vorgelegt und jeweils 1 µl Patienten-DNA, 20 µl Formamid und 0,5 µl ROX™ Size Standard hinzugefügt. Die Inkubationszeit betrug 8 s. Initial erfolgte ein Vorheizen auf 95 °C für 6 min. Es folgte die PCR, die 32 Zyklen plus 15 s umfasste. Jeder Zyklus bestand aus drei Schritten, zunächst der Denaturierung der DNA-Matrize bei 95 °C für 30 s mit der Auftrennung der DNA in ihre Einzelstränge, dann dem Annealing, d. h. der Hybridisierung der Primer bei 60 °C für 30 s. Als letzter Schritt fand die Elongation (DNA-Synthese) für 30 s bei 72 °C statt.

5.4 PCR und Gelelektrophorese

In einer PCR wurden die beschriebenen Patienten mit fraglich kurzem Repeat untersucht. Die Untersuchung wurde unabhängig voneinander in Kooperation mit dem Institut für Humangenetik in Würzburg (Dr. Wolfram Kress) und dem Medizinisch Genetischen Zentrum in München (PD Dr. Angela Abicht) durchgeführt.

Generell erfolgt diese Diagnostik der DM2 molekulargenetisch in zwei Stufen [44, 45]. Die erste Stufe ist die PCR-Amplifikation des CCTG-Repeats CL3N58 des ZNF9-Gens und des benachbarten Markers CL3N59. Durch die PCR werden die Fragmente der Patienten-DNA amplifiziert und mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert. Dabei können nur die Normalallele erfasst werden, die für eine DM2 typisch große Repeat-Expansion lässt sich mit dieser Methode nicht nachweisen [21, 44, 45]. Werden in der Fragmentanalyse zwei Normalallele detektiert, ist die Diagnose einer DM2 ausgeschlossen. Allgemein gelten folgende Definitionen: Normale Allellänge bis 220 Basenpaare, expandiertes Allel ab 250 Basenpaare. Bei der Detektion von nur einem Normalallel gibt es zwei Möglichkeiten. Das Individuum ist homozygot bezüglich des Normalallels, dies trifft bei ca. 15 % der Normalbevölkerung zu [21, 44]. Die andere Möglichkeit ist, dass das Individuum beide Allele besitzt, ein normalgroßes Allel und ein expandiertes, in der PCR aufgrund seiner Größe, nicht amplifizierbares Allel („typisch“ großes Risiko-Allel, > 75 CCTGs), das mit der Krankheit segregiert. In diesem Fall könnte in einer zweiten Stufe mittels Long-Range-PCR mit anschließendem Southern-Blot das expandierte Allel des ZNF9-Lokus nachgewiesen werden [9, 45]. Bei den zu untersuchenden Patienten sollten beide Allele detektiert werden. Da bei diesen Patienten kurze Repeat-Expansionen nachgewiesen werden sollten, wurde erwartet, dass sich in der PCR ein erhöhtes Allelprodukt zeigt. Begleitend liefen drei Kontrollen und ein Leerwert (Reaktion ohne DNA) mit. Die zu untersuchende genomische DNA aller Patienten war im Friedrich-Baur Institut, im Medizinisch-Genetischen Zentrum in München und im Institut für Humangenetik in Würzburg vorhanden. Alle Patienten hatten nach entsprechender Aufklärung, gemäß dem aktuellen Gendiagnostik Gesetz, den diagnostischen DNA-Untersuchungen und ebenso diagnostischen Muskelbiopsien schriftlich zugestimmt (siehe Appendix; 10.3 Schriftliche Einverständniserklärung).

Zur Herstellung eines Mastermixes wurden 25 µl Puffer A (1,5 mmolar), 2 µl DMSO, 1 µl Primer F (10 pmol/µl), 1 µl Primer R (10 pmol/µl) und 0,2 µl Platinum Taq angesetzt. Für n Reaktionen wurde der Mastermix (n+1)-mal angesetzt. Von diesem Mastermix wurden für jede Probe 25 µl vorgelegt und jeweils 1 µl Patienten-DNA hinzugefügt. Es folgte die PCR, die 31 Zyklen umfasste. Initial erfolgte ein Vorheizen auf 95 °C für 5 min. Dann wurde mit den Zyklen gestartet. Jeder Zyklus bestand aus drei Schritten, zunächst der Denaturierung der DNA-Matrize bei 95 °C für 30 s mit der Auftrennung der DNA in ihre Einzelstränge, dann dem Annealing, d. h. der Hybridisierung der Primer bei 56 °C für 30 s. Als letzter Schritt fand die Elongation (DNA-Synthese) für 30 s bei 72 °C statt.

Nach abgelaufener PCR wurde zur Überprüfung die amplifizierte DNA mittels Gelelektrophorese nachgewiesen. Dafür wurden auf einer Mikrotiterplatte 2 µl Ladepuffer mit 8 µl PCR-Produkt gemischt. Das Gemisch wurde auf ein 2 %iges Agarosegel geladen, das den Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid (10 µl pro 100 ml Agarosegel) enthielt. Als Gel wurde 1,5 %iges GTG Seaken Gel verwendet, der Elektrophoresepuffer war Tris-Acetat-EDTA (TAE). Die angelegte Spannung betrug 140 V, die Laufzeit mindestens 20 min.

5.5 Southern Blot

Nach der PCR wurde die Patienten-DNA in einem zweiten Schritt mittels Southern Blot analysiert, um die expandierten Allele des ZNF9-Gen-Lokus zu detektieren. Diese Untersuchung erfolgte, wie auch bereits die PCR, einmal in Kooperation mit dem Institut für Humangenetik in Würzburg (Dr. Wolfram Kress) und, unabhängig davon, mit dem Medizinisch Genetischen Zentrum in München (PD Dr. Angela Abicht).

5.6 Klonierung und Sequenzierung der genomischen DNA

5.6.1 Klonierung

Material

Genomische DNA der Patienten mit erhöhtem Allelnachweis aus der 1. PCR (siehe 5.4, 6.4.1).

TOPO®-Cloning Kit/Invitrogen: 4 µl Insert mit 3'A-Überhang, 1 µl Salzlösung, 1 µl TOPO®-Vektor, One-Shot-Zellen, SOC-Medium (SOB-Medium, Super-Optimal-Broth-Medium, komplexes Nährmedium: Hefeextrakt 5 g/l, Trypton 20 g/l, Natriumchlorid 0,6 g/l, Kaliumchlorid 0,2 g/l, Magnesiumchlorid 10 mM, Magnesiumsulfat 10 mM, mit dem Zusatz von Glucose 20 mM), Ampicillinplatte, Lysogeny broth (LB, komplexe Nährlösung: Hefeextrakt 5g/l, Trypton 10g/l, Natriumchlorid 0,5-10g/l, pH-Wert 7).

Mastermix für PCR mit Puffer A (siehe 5.6.2.1 und 5.6.2.2): 23 µl Puffer A, 1 µl Primer F-M13, 1 µl Primer R-M13, 0,2 µl Platinum Taq und 0,06 µl MgCl₂. Für n Reaktionen wurde der Mastermix (n+1)-mal angesetzt.

Mastermix für PCR mit Puffer J (siehe 5.6.2.3): 12,5 µl Puffer J, 7 µl aqua dest., 1 µl Primer F (58-HPCL-gereinigt), 1 µl Primer R (58-HPCL-gereinigt) und 0,45 µl FS-Taq-DNA-Polymerase. Für n Reaktionen wurde der Mastermix (n+1)-mal angesetzt.

Methodik im Detail

Der TOPO®-Cloning Kit/Invitrogen wurde vorbereitet. Dafür wurden 4 µl Insert mit 3'A-Überhang, 1 µl Salzlösung, 1 µl TOPO®-Vektor gemischt, für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und dann auf Eis gestellt. Die One-Shot-Zellen wurden ebenfalls auf Eis gelagert um dort etwas anzutauen. 2 µl TOPO®-Cloning Kit/Invitrogen wurden in die One-Shot-Top-

10-Zellen eingerührt, für 20 min auf Eis inkubiert, dann für 30 s in ein auf 42 °C vorgeheiztes Wasserbad gegeben und zuletzt für 2 min wieder auf Eis gestellt. Danach wurden 250 µl SOC-Medium und jeweils 2 µl genomische DNA der Patienten mit erhöhtem Allelnachweis in der 1. PCR (siehe 6.4.1) zugegeben und bei 37 °C und 200 U/min für 20 min geschüttelt. 50 µl von diesem Ansatz wurden auf einer vorgewärmten Ampicillinplatte ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Von diesen Klonen wurden zwei PCRs durchgeführt, die erste mit Puffer A und M13-Primern (siehe 5.6.2.1 und 5.6.2.2), die zweite mit Puffer J und 58-HPCL-gereinigten Primern (siehe 5.6.2.3).

5.6.2 PCR der Klone

5.6.2.1 PCR der Klone mit Puffer A und M13-Primern (1. Pickung)

Die Klone wurden von der Agarplatte gepickt (1. Pickung) und in je 7 µl LB gelöst. Angesetzt wurde für die PCR ein Mastermix mit 23 µl Puffer A, 1 µl Primer F-M13, 1 µl Primer R-M13, 0,2 µl Platinum Taq und 0,06 µl MgCl₂. Für n Reaktionen wurde der Mastermix (n+1)-mal angesetzt. Von diesem Mastermix wurden für jede Probe 25 µl vorgelegt und jeweils 3 µl Klon hinzugefügt. Es folgte die PCR, die 31 Zyklen + 1 Zyklus umfasste. Initial erfolgte ein Vorheizen auf 95 °C für 6 min. Dann wurde mit den Zyklen gestartet. Jeder Zyklus bestand aus drei Schritten, zunächst der Denaturierung der DNA-Matrize bei 95 °C für 30 s mit der Auftrennung der DNA in ihre Einzelstränge, dann dem Annealing d. h. der Hybridisierung der Primer bei 56 °C für 30 s. Als letzter Schritt fand die Elongation (DNA-Synthese) für 30 s bei 72 °C statt.

Nach abgelaufener PCR wurde zur Überprüfung die amplifizierte DNA erneut mittels Gelelektrophorese nachgewiesen. Dafür wurden auf einer Mikrotiterplatte 2 µl Ladepuffer mit 8 µl PCR-Produkt gemischt. Das Gemisch wurde auf ein 2 %iges Agarosegel geladen, das den Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid (10 µl pro 100 ml Agarosegel) enthält. Als Gel wurde GTG Seaken Gel 1,5 %ig verwendet, der Elektrophoresepuffer war TAE. Es wurde eine Spannung von 140 V angelegt, die Laufzeit betrug mindestens 20 min.

5.6.2.2 PCR der Klone mit Puffer A und M13-Primern (2. Pickung)

Da nach der PCR von 5.6.2.1 bei Patient Nr. 8 kein Klon in der Gelelektrophorese nachweisbar war, und sich bei den Patienten Nr. 2, 7 und 9 nur schwache Banden zeigten (siehe 6.6.1, Tabelle 6 und 6.6.2.1, Abb. 29 - 35), wurden die Agarplatten mit den DNA-Klonen dieser vier Patienten nochmals inkubiert. Es wurden ein zweites Mal Klone gepickt (2. Pickung) und erneut per PCR mit Puffer A und M-13-Primern amplifiziert.

5.6.2.3 PCR der Klone mit Puffer J und 58-HPCL-gereinigten Primern

Nach Auswertung der Ergebnisse der PCR der Klone mit Puffer A aus der 1. und 2. Pickung erschien es zur Optimierung des PCR-Produkts sinnvoll, eine zweite PCR mit Puffer J und spezifischen 58-HPCL-gereinigten Primern anzuschließen. Auch diese PCR wurde mit Klonen, sowohl aus der 1., als auch der 2. Pickung durchgeführt.

Zur Herstellung des Mastermixes wurden 12,5 µl Puffer J, 7 µl aqua dest., 1 µl Primer F (58-HPCL-gereinigt), 1 µl Primer R (58-HPCL-gereinigt) und 0,45 µl FS-Taq-DNA-Polymerase angesetzt. Für n Reaktionen wurde der Mastermix (n+1)-mal angesetzt. Von diesem Mastermix wurden für jede Probe 21,8 µl vorgelegt und jeweils 3 µl Klon-Probe hinzugefügt. Es

folgte die PCR, die 34 Zyklen + 1 Zyklus umfasste. Initial erfolgte ein Vorheizen auf 95 °C für 6 min. Dann wurde mit den Zyklen gestartet. Jeder Zyklus bestand aus drei Schritten, zunächst der Denaturierung der DNA-Matrize bei 95 °C für 30 s mit der Auftrennung der DNA in ihre Einzelstränge, dann dem Annealing, d. h. der Hybridisierung der Primer bei 56 °C für 30 s. Als letzter Schritt fand die Elongation (DNA-Synthese) für 30 s bei 72 °C statt.

Nach abgelaufener PCR wurde zur Überprüfung die amplifizierte DNA mittels Gelelektrophorese nachgewiesen. Dafür wurden auf einer Mikrotiterplatte 2 µl Ladepuffer mit 8 µl PCR-Produkt gemischt. Das Gemisch wurde auf ein 2 %iges Agarosegel geladen, das den Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid (10 µl pro 100 ml Agarosegel) enthielt. Als Gel diente 1,5 %iges GTG Seaken Gel, der Elektrophoresepuffer war TAE. Es wurde eine Spannung von 140 V angelegt, die Laufzeit betrug mindestens 20 min.

5.6.3 Sequenzierung der Klone

Das Ziel der Sequenzierung war die möglichst genaue Bestimmung der CCTG-Repeat-Anzahl. In der Literatur wird von folgendem Ansatz ausgegangen: Das Complex-Repeat-Motiv $(TG)_n$ $(TCTG)_n$ $(CCTG)_n$ ist im Gesunden zwischen 104 und 176 Basenpaare lang. Alle Normalallele enthalten 11 - 26 Tetranukleotide mit 1 - 2 Unterbrechungen durch die Motive TCTG und GCTG. Diese sind variabel in ihrer Anzahl. Bei expandierten Allelen sind die CCTG-Repeats größer als 372 Basenpaare und nicht unterbrochen [45].

Die in 5.6.2.3, mittels PCR mit J-Puffer, amplifizierten Klone aus der 1. und teilweise 2. Pickung wurden sequenziert. Da bei zwei Patienten fragliche Doppelklone/Artefakte abzulesen waren (siehe 6.6.2.3), wurde bei diesen zusätzlich zu der allgemeinen Sequenzierung eine weitere Sequenzierung aus den in 5.6.2.1 beschriebenen Klonen durchgeführt. Dabei handelte es sich um die Klone aus der 1. Pickung und Amplifikation mittels Puffer A und M13-Primern.

Methodik im Detail

Die Sequenzierung wurde in vier unterschiedlichen Ansätzen durchgeführt. Zunächst ohne einen Enhancer, jeweils einmal mit Primer F und einmal mit Primer R. Dann mit 2,5 µl Enhancer, ebenfalls einmal mit Primer F und einmal mit Primer R.

Pro Klon wurden 0,25 µl Shrimps alkalische Phosphatase (SAP), 0,25 µl Exonuklease und 4 µl aqua dest gemischt. Es folgte eine Inkubation zunächst für 30 min bei 37 °C, dann für 15 min bei 85 °C. Zuletzt wurden 0,5 µl M-13 Primer, 1 µl Big Dye (markierte Basen), 2 µl Puffer (5x) und 2 µl Kolonie-PCR hinzugefügt.

Das anschließende Sequenzierprogramm umfasste folgende Schritte: Initial ein Vorheizen bei 96 °C für 2 min 30 s. Dann Schritt 1 bei 96 °C für 2 min 30 s, Schritt 2 bei 98 °C für 20 s, Schritt 3 bei 60 °C für 1 min 30 s und zuletzt Schritt 4 bei 50 °C für 2 min. Nach einem Durchlauf wieder zurück zu Schritt 2, insgesamt 28 Zyklen. Daran schloss sich ein Arbeitsablauf an, der von einem Roboter durchgeführt wurde: 1. Beads verteilen, 2. 85 %iges Ethanol zugeben, 3. Mixen, 4. Platte zum Magneten, 5. Überstand abnehmen, 6. Mit 85 %igem Ethanol waschen, 7. Trocknen lassen, 8. Elutionspuffer verteilen (Formamid), 9. Überführung in frische Sequenzierplatte. Die DNA-Sequenzierung wurde nach der Didesoxymethode nach Sanger (Kettenabbruchmethode) durchgeführt. Unter Verwendung von 2'-3'-Didesoxynukleotiden (ddNTP) wurde in vitro eine DNA-Replikation des interessierenden DNA-Moleküls durchgeführt. Vier parallele Ansätze enthielten je eine der vier in der DNA vorkommenden Basen als ddNTP. In jedem Ansatz wurden nach dem Zufallsprinzip ddNTPs in den komplementären DNA-Strang eingebaut, wodurch die DNA-Synthese zum Stillstand kam. Die Syntheseprodukte unterschiedlicher Länge jedes Ansatzes wurden gelelektrophoretisch analysiert und aus dem Bandenmuster die Basensequenz ermittelt [32].

5.7 CLCN1 splicing assay

RNA-Extraktion

Material

Muskelzellen, gewonnen aus den Muskelbiopsaten der Patienten Nr. 1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9.

14,3 M (pure liquid) β -Mercaptoethanol (β -ME); sterile, RNase-freie Pipettenspitzen; Mikrozentrifuge; 70 %iges Ethanol; RLT-Puffer; RW1-Puffer; RPE-Puffer; RNase-freies Wasser

Ausstattung für den Zellaufschluss und die Homogenisierung: Trypsin und PBS; QIAshredder Homogenizer; Mörser und Pistill; TissueLyser

Methoden

Die durchgeführte Methode orientierte sich am Qiagen Kit Protokoll. Initial wurde der RLT-Puffer angesetzt. Dafür wurden 10 μ l β -Mercaptoethanol pro 1 ml Puffer RLT gemischt. Dies führte zu einer Zerstörung der Zellwände, dadurch lösten sich die DNA, die RNA und die Proteine heraus. 600 μ l des β -ME-enthaltenden Puffers wurden in jedes Cap mit den Muskelzellen der Patienten pipettiert, es entstand ein zähflüssiges Lysat. Ab diesem Schritt war ein Arbeiten bei Raumtemperatur möglich. Das Lysat wurde in QIAshredder spin column pipettiert und für 2 min bei 14.000 rpm zentrifugiert. Je 600 μ l 70 %iges Ethanol wurde hinzugefügt (Fällen der DNA), durch Pipettieren gemischt, aber nicht zentrifugiert. Es folgte die Übertragung von jeweils 700 μ l in RNeasy spin column, d. h. auf eine Membran, an der RNA gebunden wird und ein Zentrifugieren für 15 s bei 10.000 rpm. Das Lysat wurde verworfen, die RNA haftete an der Membran. 700 μ l RWI-Puffer wurde auf jede Membran pipettiert und für 15 s bei 10.000 rpm zentrifugiert (Herausfiltern von Proteinen und DNA; Waschen der Spin column Membran). Das Lysat wurde verworfen. Je 500 μ l RPE-Puffer wurden in die RNeasy spin column auf die Membran pipettiert und für 15 s bei 10.000 rpm zentrifugiert. Das Lysat wurde erneut verworfen. 500 μ l RPE-Puffer wurde in jedes RNeasy spin column gegeben, für 2 min bei 10.000 rpm zentrifugiert, um die Spin column Membran zu trocknen und zu verhindern, dass Ethanol während der RNA-Eluierung verschleppt wird. Jeweils 50 μ l RNase-free water wurde in die RNeasy spin column auf die Membran pipettiert, um die RNA von der Membran zu lösen. Die Zentrifugation fand für 1 min bei 10.000 rpm statt. Das Eluat wurde bei -80 °C eingefroren.

Diese Methodik wurde in Zusammenarbeit mit dem Medizinisch Genetischen Zentrum München (PD Dr. Angela Abicht) durchgeführt.

VI. Ergebnisse

6.1 Immunhistochemie

Die Untersuchung mittels Immunhistochemie erfolgte in mehreren Stufen. Zunächst wurde eine Versuchsreihe mit genetisch gesicherten DM2-Patienten mit einem „typisch“ expandierten Repeat (> 75 CCTGs) durchgeführt. Hier zeigte sich eine gute Übereinstimmung zwischen den mit DAPI angefärbten, zentral gelegenen Zellkernen und den mit monoklonalen Antikörpern, gegen das CUGBP1 und MBNL 1a, 1b, 2a, 3a, markierten ribonukleären Foci. Angeordnet waren diese in „Nestern“, d. h. meist waren mehrere Muskelzellen unmittelbar nebeneinander betroffen. Andere Muskelzellen in der Peripherie waren kaum bis nicht betroffen. Meist fand sich ein Focus pro Muskelzelle, mitunter konnten auch mehrere Foci pro Muskelzelle detektiert werden. Bei den Normalkontrollen waren keine Foci nachweisbar. Im Anschluss daran wurde die Untersuchung auch bei den DM2-Patienten mit kurzem Repeat durchgeführt. Auch bei diesen Patienten zeigte sich eine signifikante Übereinstimmung zwischen den Zellkernen und den mit monoklonalen Antikörpern markierten Foci (Abb. 12 a - d). Allerdings war die Anzahl und Häufigkeit der Foci im Vergleich mit den klassischen DM2-Patienten mit normal großem Repeat reduziert (Abb. 13 a, b). Bei den Normalkontrollen und den zusätzlich mitgefärbten Kontrollen von Patienten mit genetisch gesicherten anderen Muskelerkrankungen, waren keine Kern-Focus-Übereinstimmungen zu finden (Abb. 14). Ausnahme bildete eine Normalkontrolle, die sich stark positiv zeigte, ähnlich den Ergebnissen der DM2-Patienten mit einem „typisch“ expandierten Repeat (> 75 CCTGs, Abb. 15).

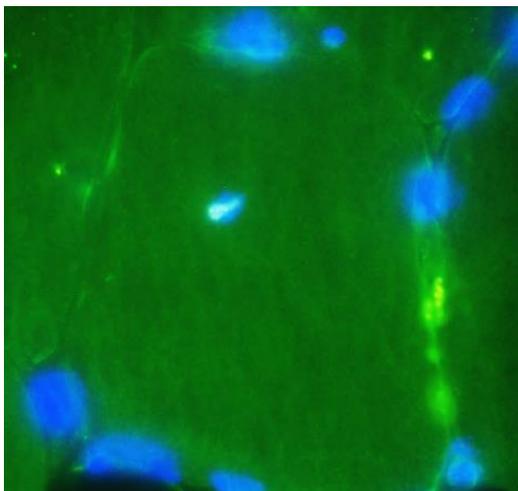


Abbildung 12 a Pat.-Nr. 2



Abb. 12 b CUGBP1



Abb. 12 c MBNL2



Abb. 12 d DAPI

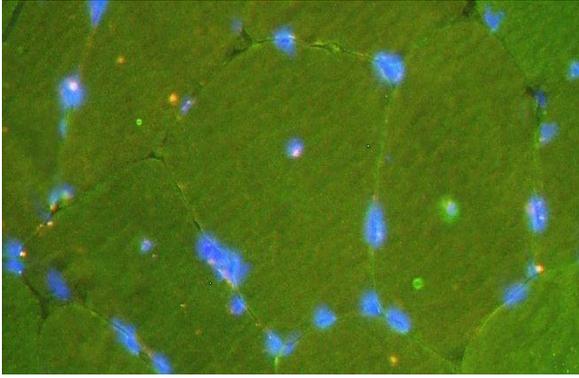


Abb. 13 a Patient, „typisch“ expandiertes Repeat (> 75 CCTGs)

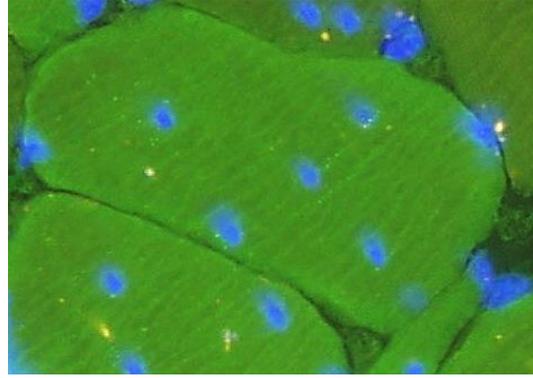


Abb. 13 b Patient, „typisch“ expandiertes Repeat (> 75 CCTGs)

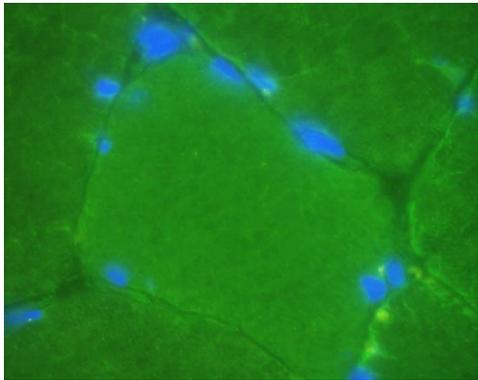


Abb. 14 Normalkontrolle

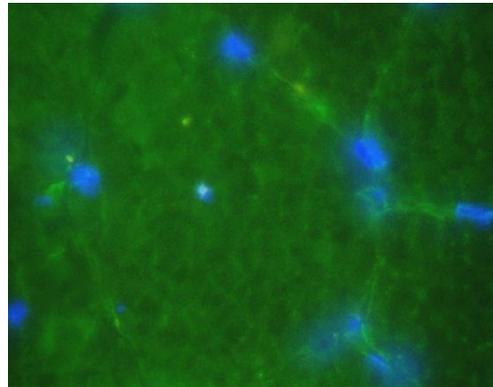


Abb. 15 „positive Normalkontrolle“

6.2 Fluoreszenz in situ Hybridisierung

Acht Patienten mit „kurzem CCTG-Repeat“ und zwei genetisch gesicherte DM2-Patienten wurden untersucht. Bei den klassischen DM2-Patienten (> 75 CCTGs) zeigten sich in den Zellkernen lokalisierte Foci, ca. 1 - 4 pro Kern (Abb. 16). Im Zytoplasma waren keine Foci nachweisbar. Im Vergleich zu den DM2-Patienten mit kurzem Repeat war eine deutlich höhere Anzahl an positiven Foci tragenden Zellkernen nachweisbar. Bei den DM2-Patienten mit kurzem Repeat war die Zahl an Zellkernen mit ribonukleären Einschlüssen, die die CCTG-Expansionen tragen, deutlich reduziert. Pro Kern konnten aber ebenfalls ca. 1 - 4 Foci detektiert werden (Abb. 17, 18). Bei einem Patienten (Pat.-Nr. 6) zeigten sich sehr zahlreiche Foci tragende Zellkerne, das Bild ähnelte dem der DM2-Patienten mit einem „typisch“ expandierten Repeat (> 75 CCTGs), d. h. einer Vollmutation. Die Normalkontrollen waren ohne pathologischen Befund (Abb. 19).



Abb. 16 Patient, „typisch“ expandiertes Repeat (> 75 CCTGs)

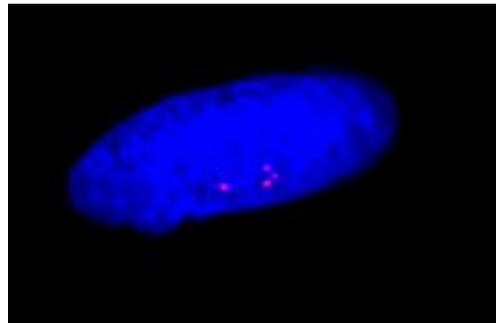


Abb. 17 Patient, kurzes Repeat (Pat.- Nr.2)

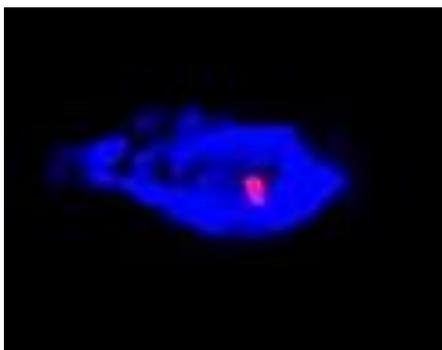


Abb. 18 Patient, kurzes Repeat (Pat.- Nr. 1)

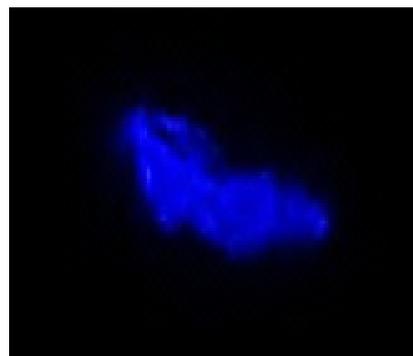


Abb. 19 Normalkontrolle

6.3 Triplet-Repeat-Primed PCR

Das TP-PCR-Signal besteht aus vertikalen Peaks mit einer 4-Basenpaar-Periodizität, die dem CCTG-Repeat entspricht. Die Normalkontrolle wies keine derartigen Peaks auf, hier waren lediglich die zwei Normalallele sichtbar (Abb. 20). Eine Vollmutation zeigte eine große Anzahl an vertikalen Peaks (Abb. 21, Pat.-Nr. 6). Das Ergebnis der TP-PCR für die untersuchten Patienten lässt sich aus Tabelle 3 und den Abbildungen 21 - 23 ablesen.

Nr.	Patientennummer	Ergebnis
1	5	390 bp
2	4	240 bp
3	8	234 bp
4	3	413 bp
5	6	Vollmutation
6	2	252 bp
7	7	240 bp
8	9	252 bp
9	10	185 bp
10	11	264 bp
11	Normalkontrolle 1	Normalbefund
12	Normalkontrolle 2	Normalbefund
13	Normalkontrolle 3	Normalbefund
14	Kontrolle Vollmutation 1	450 bp
15	Kontrolle Vollmutation 2	417 bp
16	Kontrolle Vollmutation 3	467 bp
17	Kontrolle Prämutation	234 bp

Tabelle 3 Triplet-Repeat-Primed PCR: Anzahl der Basenpaare (bp)

Bei allen Patienten zeigten sich Mutationsmuster mit bis zu 400 Basenpaaren. Beispielfür die untersuchten Patienten stehen die Graphiken der Patienten Nr. 2 und Nr. 11. Bei beiden sind deutlich vertikale Peaks zu erkennen, die dem CCTG-Repeat mit ca. 252 (Pat.-Nr. 2; Abb. 22) bzw. 264 Basenpaaren (Pat.-Nr. 11; Abb. 23) entsprechen.

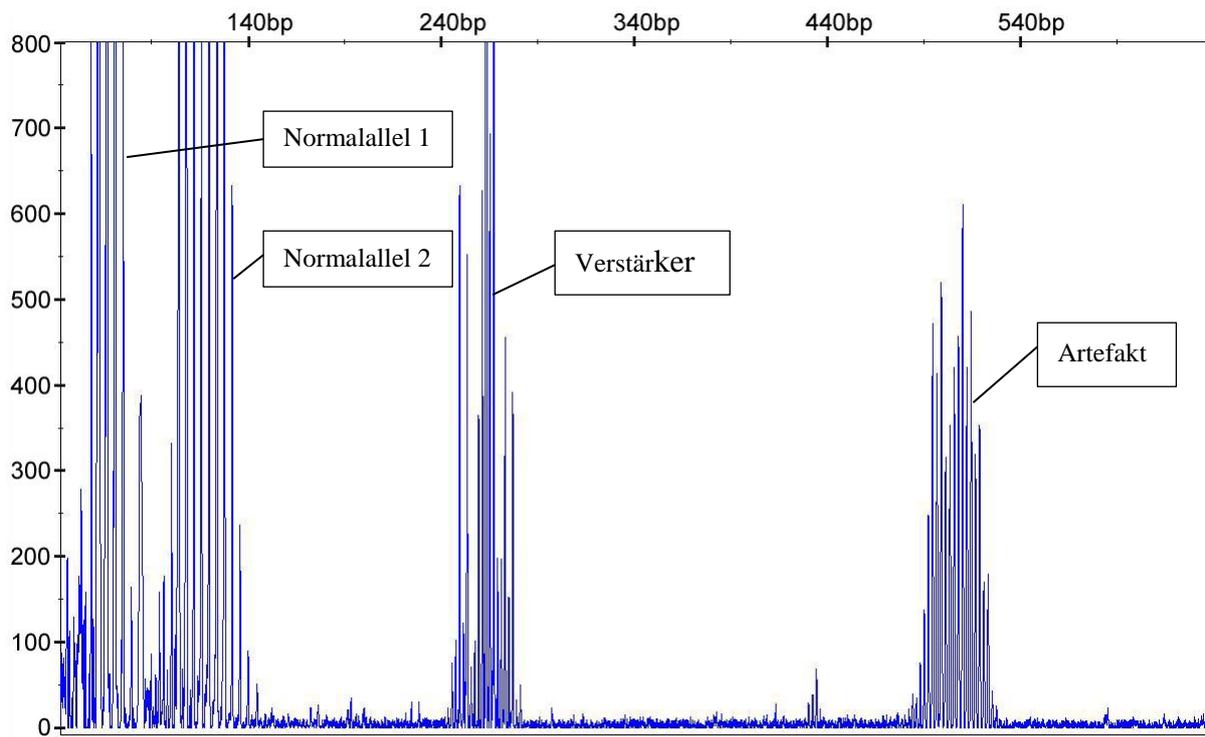


Abb. 20 Normalkontrolle 1

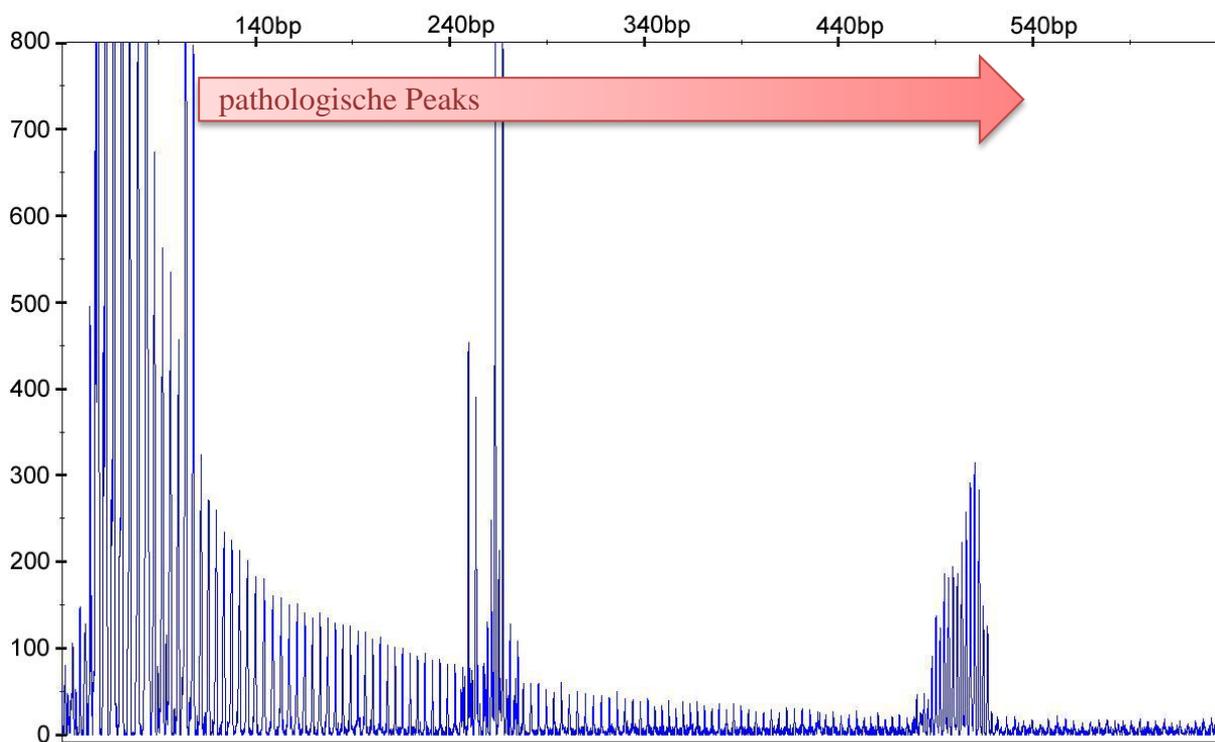


Abb. 21 Vollmutation Nr. 5 (Pat.-Nr. 6); Allel-Größe > 390 bp

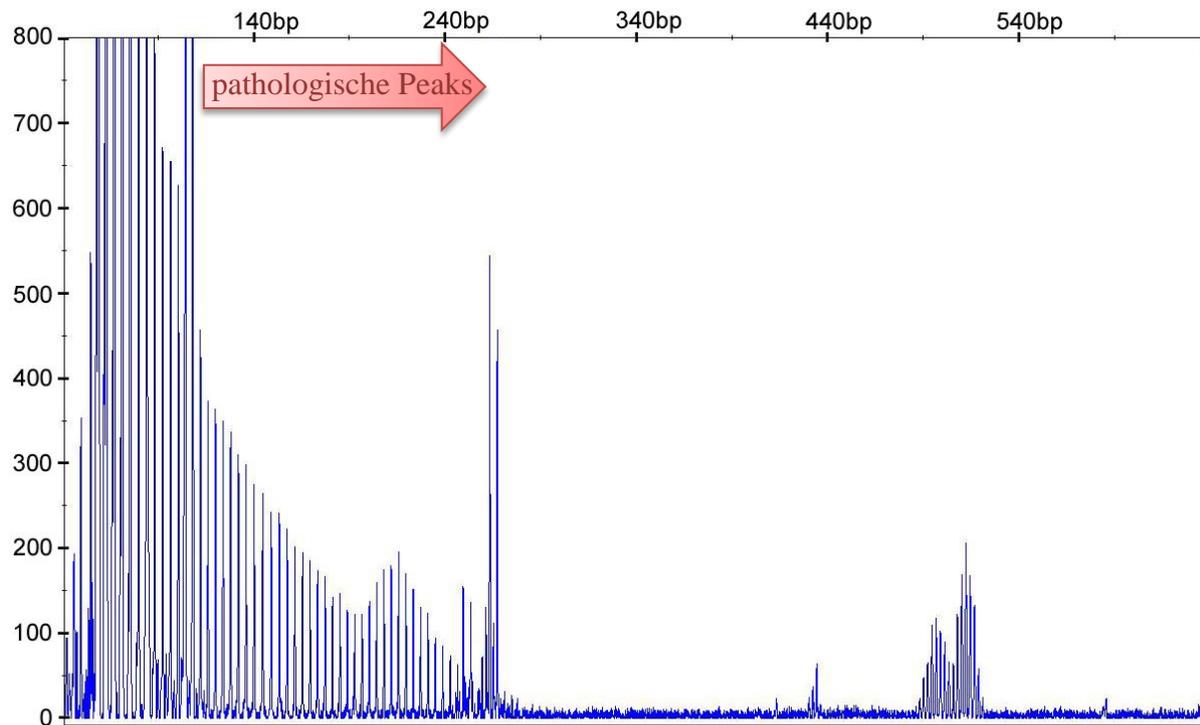


Abb.22 Prämutation Nr. 6 (Pat.-Nr. 2): jüngerer Bruder

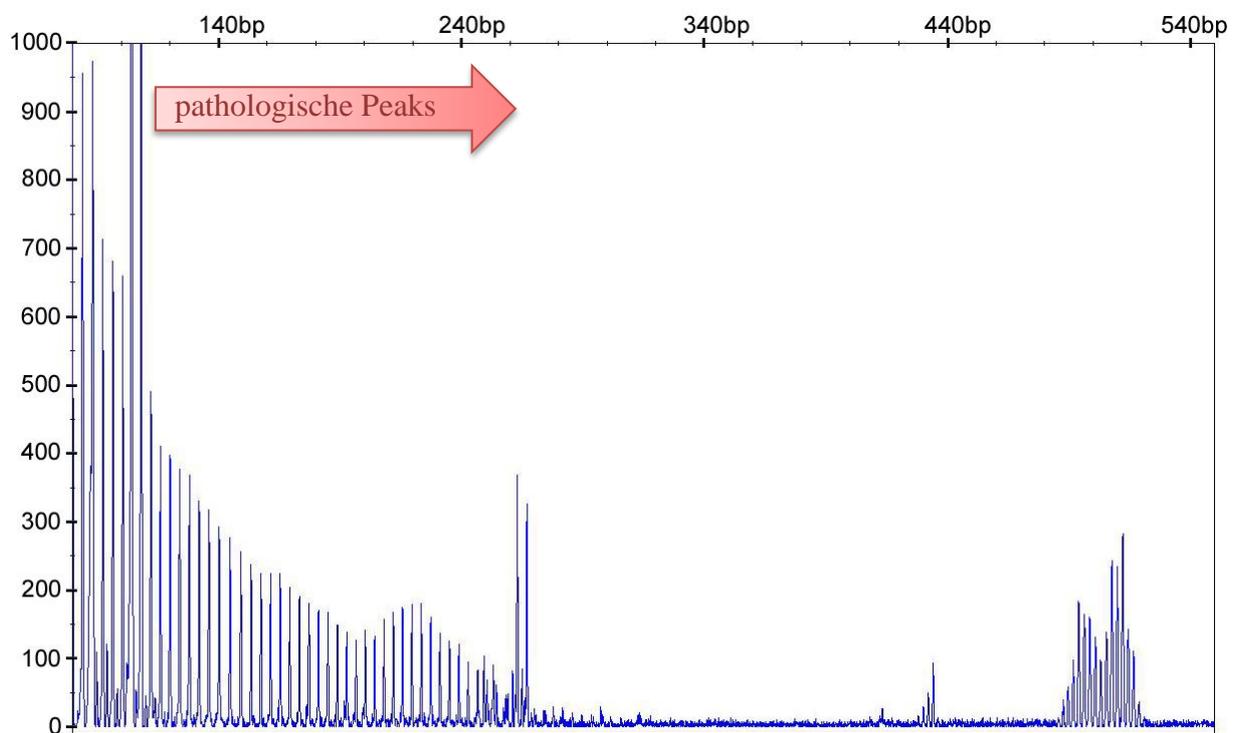


Abb. 23 Prämutation Nr. 10 (Pat.-Nr. 11): älterer Bruder

6.4 PCR und Gelelektrophorese

6.4.1 Ergebnisse in Kooperation mit dem Institut für Humangenetik Würzburg

Bei sechs Patienten zeigte sich ein erhöhtes Produkt, d. h. ein expandiertes Allel. Bei zwei Patienten war in der PCR kein Produkt (kein expandiertes Allel) sichtbar. Die Kontrollen waren ohne pathologischen Befund. Ein Patient (Pat-Nr. 6) erwies sich erneut als eine Vollmutation für eine DM2 (Tabelle 4, Abb. 24).

Nummer	Patientennummer	Ergebnis
1	5	kein expandiertes Allel
2	4	expandiertes Allel
3	8	expandiertes Allel
4	3	kein expandiertes Allel
5	6	Vollmutation
6	2	expandiertes Allel
7	7	expandiertes Allel
8	9	expandiertes Allel
9	10	expandiertes Allel
10	Normalkontrolle 1 (K1)	gesunde Kontrolle
11	Normalkontrolle 2 (K2)	gesunde Kontrolle
12	Normalkontrolle (K3)	gesunde Kontrolle
13	Leerwert (Lw)	

Tabelle 4 PCR, Institut für Humangenetik Würzburg

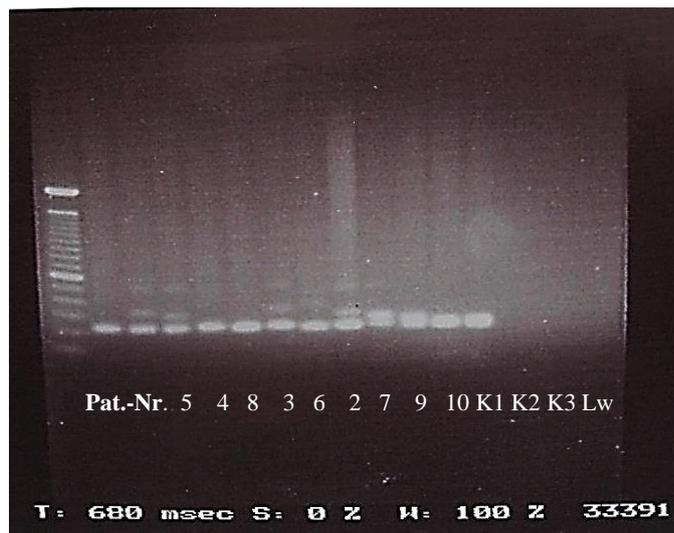


Abb. 24 Gelelektrophorese, Institut für Humangenetik Würzburg

6.4.2 Ergebnisse in Kooperation mit dem Medizinisch Genetischen Zentrum München

Alle untersuchten Patienten zeigten ein erhöhtes Produkt (expandiertes Allel, Abb. 25). Die Zahl der Basenpaare erstreckte sich über einen Bereich von 278 bis 390 Basenpaare. Die Kontrollen zeigten Normalallele. Auch in der PCR konnte eine Probe als eine Vollmutation für eine DM2 identifiziert werden (Pat.-Nr. 6).

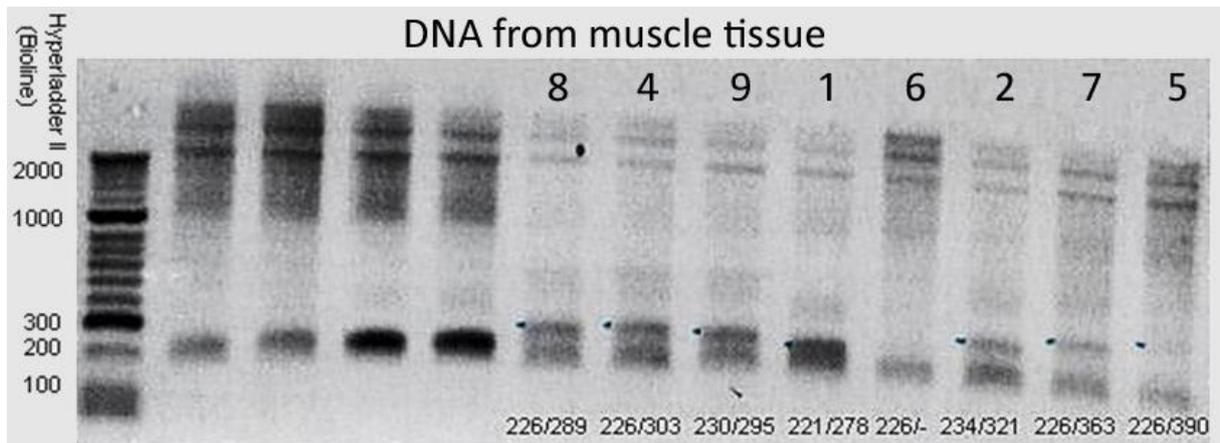


Abb. 25 PCR und Gelelektrophorese, Medizinisch Genetisches Zentrum München (PD Dr. Angela Abicht)

6.5 Southern Blot

Im Anschluss an die PCRs wurde die DNA aller Patienten in einem zweiten Schritt mittels Southern Blot analysiert.

6.5.1 Ergebnisse in Kooperation mit dem Institut für Humangenetik Würzburg

Drei Patienten wurden untersucht (Tabelle 5). Hierbei konnten die expandierten Allele des ZNF9-Gen-Lokus detektiert werden. Patient Nr. 11 (Nr. 3) und Patient Nr. 3 (Nr. 7) zeigten einen kurzen Schmier im Southern Blot (Abb. 26). Ein langer Schmier war bei Patient Nr. 6 (Nr. 9) zu sehen, der sich schon in den bereits beschriebenen Methoden als Vollmutation erwiesen hatte.

Nummer	Patientennummer
1	DM2-Positivkontrolle 1
2	DM2-Negativkontrolle 1
3	Pat.-Nr. 11
7	Pat.-Nr. 3
9	Pat.-Nr. 6
13	Prämutationslimit
17	DM2-Positivkontrolle 2
18	DM2-Negativkontrolle 2
19	Leerwert (Lw)

Tabelle 5 Southern Blot, Institut für Humangenetik Würzburg (Dr. Wolfram Kress)

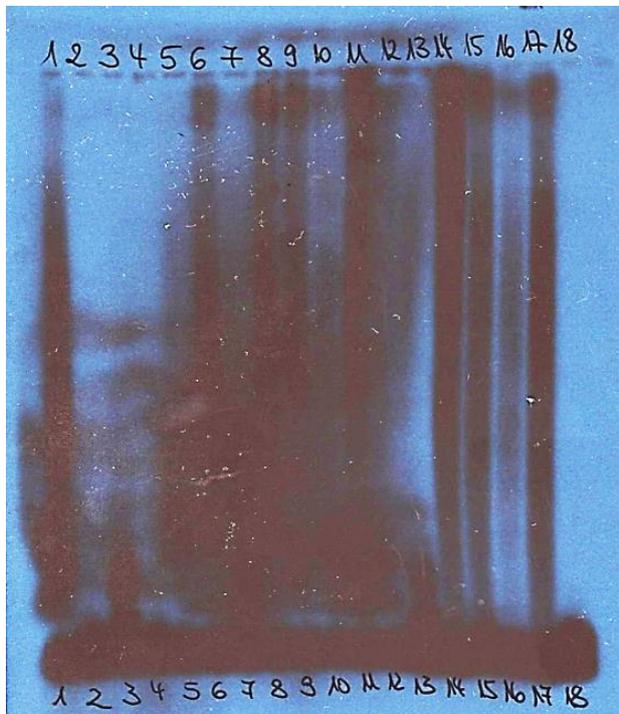


Abb. 26 Southern Blot Analyse und Gelelektrophorese, Institut für Humangenetik Würzburg (Dr. Wolfram Kress)

6.5.2 Ergebnisse in Kooperation mit dem Medizinisch Genetischen Zentrum München

Die Detektion des expandierten Allels gelang bei allen untersuchten Patienten. Sie zeigten einen kurzen Schmier. Ein kontinuierlicher Schmier war, wie auch in 6.5.1 beschrieben, bei Patient Nr. 6 zu sehen und bestätigte erneut das Ergebnis einer Vollmutation aus der PCR (Abb. 27). Der Vergleich zwischen DNA von Muskelzellen und DNA von Blutzellen zeigte, dass die Mosaikbildung im Blut deutlich höher ist (Abb. 28).

Abb. 27 DNA,
aus Muskelzellen

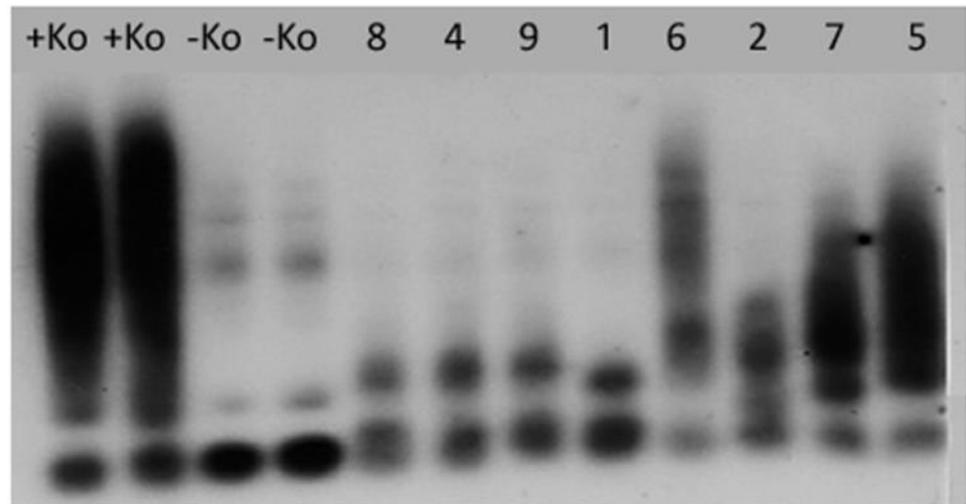
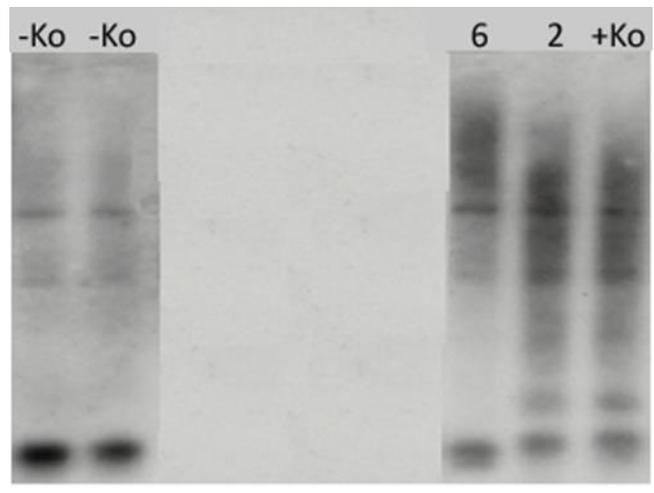


Abb. 28 DNA,
aus Blutzellen



6.6 Klonierung und Sequenzierung der genomischen DNA

6.6.1. Klonierung

Nummer	Patientennummer	Klon-Anzahl
2	4	1
3	8	kein Klon
6	2	2
7	7	1
8	9	2
9	10	4
10	Normalkontrolle 1	kein Klon
11	Normalkontrolle 2	kein Klon
12	Normalkontrolle 3	kein Klon

Tabelle 6 Anzahl der Klone

6.6.2 PCR der Klone

6.6.2.1 PCR der Klone mit Puffer A und M13-Primern (1. Pickung)



Abb. 29 Patient Nr. 4, ein Klon



Abb. 30 Patient Nr. 2, zwei Klone



Abb. 31 Patient Nr. 8, kein Klon

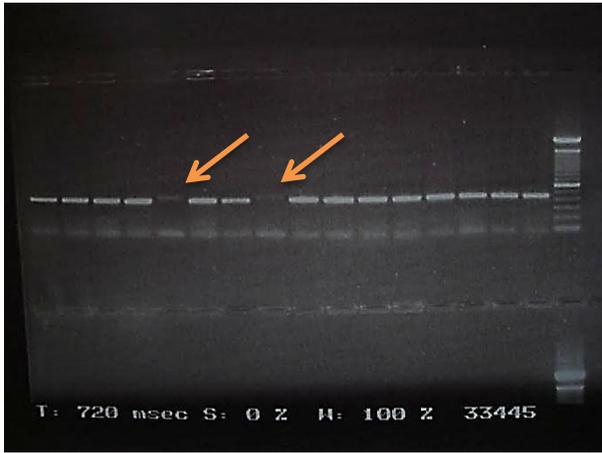


Abb. 32 Patient Nr. 9, zwei Klone



Abb. 33 Patient Nr. 7, 1 Klon

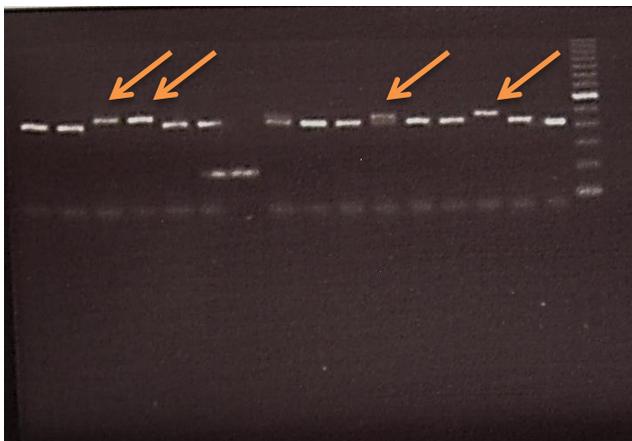


Abb. 34 Patient Nr. 10, 4 Klone



Abb. 35

Normalkontrolle 1

Normalkontrolle 2

6.6.2.2 PCR der Klone mit Puffer A und M13-Primern (2. Pickung)

Bei den Patienten Nr. 8 und Nr. 2 war kein Klon nachweisbar, bei den Patienten Nr. 7 und Nr. 9 gelang der Klon-Nachweis.

6.6.2.3 PCR der Klone mit Puffer J und 58-HPCL-gereinigten Primern

Bei den Patienten ließ sich ein gutes PCR-Ergebnis aus der Gelelektrophorese ablesen, d. h. die Klone waren als deutliche Banden sichtbar (Abb. 36, 37). Das Ergebnis bei den Patienten Nr. 4 und Nr. 2 könnte auch als Doppelklon gewertet werden (d. h. mit Normalallel). Alternativ sind diese Banden aber als Artefakte zu werten (Dr. Wolfram Kress, Institut für Humangenetik Würzburg).

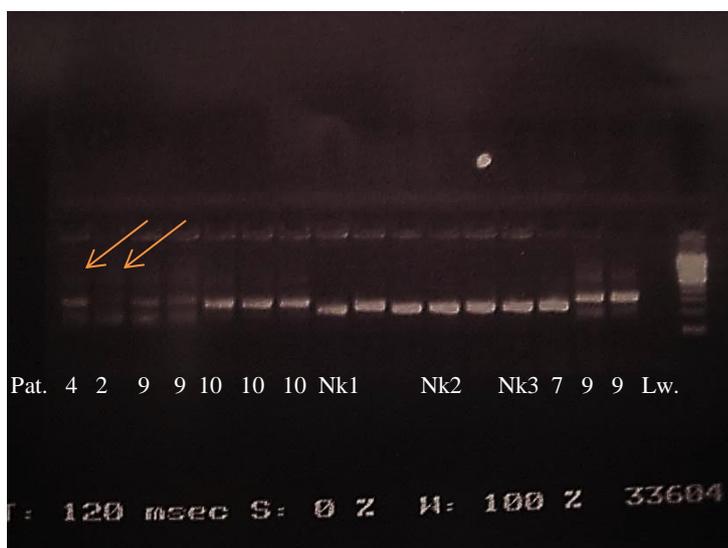


Abb. 36 Ergebnis nach 15 min.

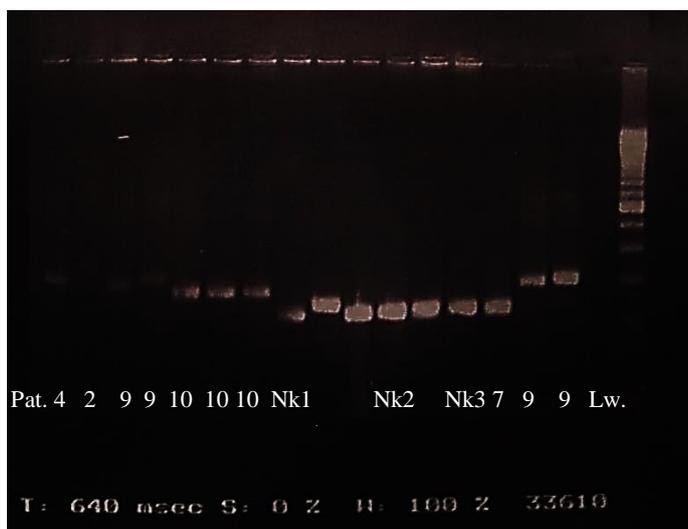


Abb. 37 Ergebnis nach 30 min.

6.6.3 Sequenzierung der Klone

Die verschiedenen Sequenzierungsansätze wurden unabhängig voneinander ausgewertet. Das Ergebnis der Auszählung des Complex-Repeat-Motivs, (TG)_n (TCTG)_n (CCTG)_n, war in allen Ansätzen nahezu identisch. Die Anzahl von TG und TCTG zwischen den Patienten war annähernd übereinstimmend, auch im Vergleich mit den Normalkontrollen. Die CCTG-Expansion pendelte sich bei 32 - 36 Repeats ein. Die Normalkontrollen wiesen zwischen 13 - 15 Repeats auf. Zwei Patienten waren auf Grund der Größe ihres Repeats nicht sequenzierbar, bei einem Patienten war die Sequenzierung des CCTG-Repeats nicht auszählbar (siehe Tabelle 7, Abb. 38)

Patientennummer	(TG) _n	(TCTG) _n	(CCTG) _n	Unterbrechungen im CCTG-Repeat	Repeatgröße
10	19	9	21	1	185
9	17	7	32	1	252
4	17	8	32	0	240
2	18	8	36	2	252
7	14	9	/	0	/
Normalkontrolle 1 (Nk 1)	19	8	15	1-2	/
Normalkontrolle 2 (Nk 2)	18	9	14	1	/
Normalkontrolle 3 (Nk3)	18	7	13	1	/
DM2-Kontrolle	26	10	75	0	> 540

Tabelle 7 Complex-Repeat-Motiv

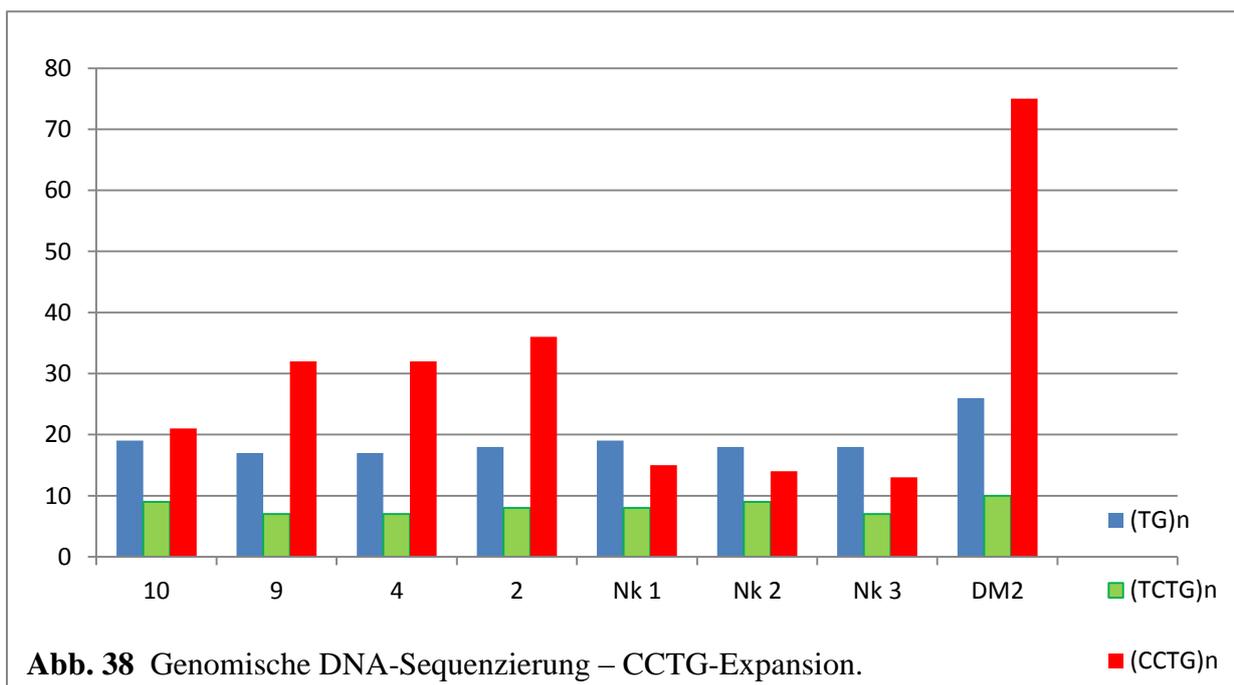


Abb. 38 Genomische DNA-Sequenzierung – CCTG-Expansion.

6.7 CLCN1 splicing assay

Im CLCN1 splicing assay konnte bei allen Patienten eine Hauptbande identifiziert werden, die dem physiologisch gespleißten CLCN1-Transkript entspricht. Fünf Patienten (Nr. 2, 4, 7, 8, 9, siehe Abb. 39) zeigten ein zusätzliches aberrant gespleißtes CLCN1-Transkript, das Genregionen zwischen Exon 6 und Exon 7 enthält (Exon 6b und Exon 7a). In den Kontrollen war ein aberrant gespleißtes CLCN1-Transkript nicht nachweisbar.

PCR on cDNA, exon primers in exon 6 and exon 8

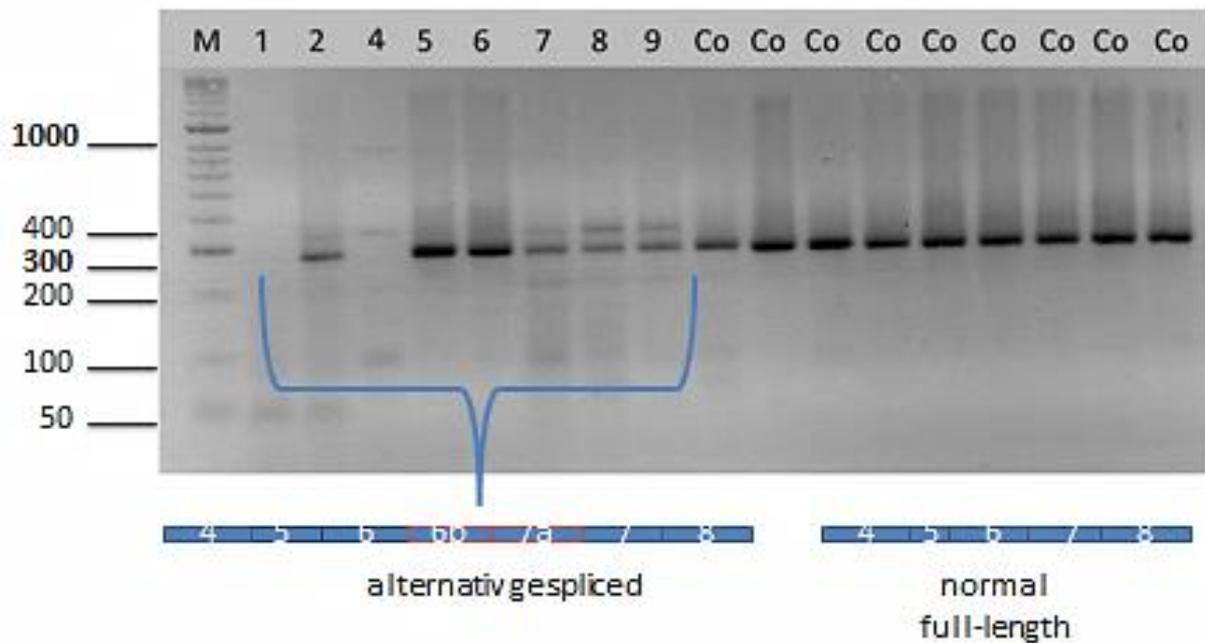


Abb. 39 CLCN1 splicing assay; PCR aus cDNA, Exon Primer in Exon 6 und Exon 8 (PD Dr. Angela Abicht, Medizinisch Genetisches Zentrum München)

VII. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wird die Pathogenität kurzer CCTG-Repeat-Expansionen bei der Myotonen Dystrophie Typ 2 evaluiert. Anhand molekulargenetischer Nachweismethoden ließen sich die für die DM2 bekannten pathogenetischen Mechanismen nachweisen und eine Korrelation zum Phänotyp der DM2 bei allen untersuchten Patienten herstellen.

Der zentrale Pathomechanismus der Myotonen Dystrophie Typ 2, das expandierte CCTG-Repeat, kann mittels PCR und Southern Blot auf DNA-Ebene nachgewiesen werden. Bei den untersuchten Patienten kann man diese Untersuchung als Vorscreening bezüglich der Repeatgröße ansehen, da mit dieser Methode nur Normalallele erfasst werden können. Ein für die Myotone Dystrophie Typ 2 typisch expandiertes Allel ist zu groß und deshalb nicht amplifizierbar [21, 44, 45]. Bei zwei Patienten ist in der PCR kein Produkt sichtbar, was darauf schließen lässt, dass bei beiden das Repeat zu groß ist. Bei allen anderen untersuchten Patienten lässt sich ein erhöhtes Produkt nachweisen. Dies spricht für ein verlängertes Allel und damit für ein verlängertes Complex-Repeat-Motiv. Dass ein Nachweis möglich ist, spricht aber wiederum für ein kürzeres Repeat als das typisch große Risikoallel von DM2-Patienten. Im Anschluss erfolgte eine Southern Blot Analyse. Bei der Interpretation des Southern Blot gilt allgemein Folgendes: Eine Vollmutation zeigt sich als ein langer, kontinuierlicher Schmier [9, 44, 45], eine Prämutation als ein kürzerer Schmier. Bei den untersuchten Patienten ist der kurze Schmier vorhanden und damit der Nachweis eines verlängerten Allels - es scheint eine Prämutation vorzuliegen.

Um die Repeat-Expansion nicht nur nachweisen, sondern auch quantifizieren zu können, und um den Terminus „kurzes Repeat“ genauer zu verifizieren, wurde eine Triplet-Repeat-Primed PCR angeschlossen und die genomische DNA sequenziert. In der TP-PCR zeigten sich bei allen Patienten Mutationsmuster bis zu ca. 400 Basenpaaren. Beispielhaft für die untersuchten Patienten stehen die Graphiken der Patienten Nr. 2 und Nr. 11 (Abb. 22, 23). Hier waren deutlich vertikale Peaks zu erkennen, die dem CCTG-Repeat und ca. 252 bzw. 264 Basenpaaren entsprechen. Von besonderer Bedeutung ist zudem, dass es sich bei den als Prämutationsbeispiel angeführten Patienten um Brüder mit einer ähnlichen Prämutation handelt, die höchstwahrscheinlich von der fremdanamnestisch auffälligen, bereits verstorbenen Mutter, vererbt wurde. Die Annahme, dass es sich hierbei um Prämutationen handelt, bestätigt sich auch im Vergleich mit dem Ergebnis eines als Vollmutation identifizierten Patienten (Pat.-Nr. 6). Bei diesem Patienten erstrecken sich die Peaks über einen Bereich von mehr als 540 Basenpaaren, was bedeutet, dass hier eine sehr große CCTG-Repeat-Expansion vorliegen muss. Für die Sequenzierung wurde das CCTG-Repeat kloniert und anschließend mit der Kettenabbruchmethode nach Sanger sequenziert. Es wurde eine Repeatgröße zwischen 32 und 36 CCTGs detektiert. Damit konnte die „zentrale Schlüsselfigur“ der Molekularpathogenese, das expandierte, aber verkürzte Repeat, bei allen Patienten erfolgreich nachgewiesen werden.

Auf RNA-Ebene führt das expandierte CCTG-Repeat zu einer RNA-Prozessierungs- und Metabolisierungsstörung, da es Proteine des Zellkerns binden oder beeinflussen kann, wie die zwei RNA-Bindungsproteine CUGBP1 und MBNL1 [29]. Folgen sind eine CUGBP1-Überexpression bzw. MBNL1-Depletion [30, 31], nachweisbar mittels Immunhistochemie und Fluoreszenz in situ Hybridisierung. In der Immunhistochemie konnte das Vorliegen von CCTG-Repeats in den Muskelzellkernen der Patienten nachgewiesen werden. Dies geschah indirekt mittels monoklonalen Antikörpern wie CUGBP1 und MBNL1-3, nach der von Holt beschriebenen Methodik [40]. Kern-Foci-Übereinstimmungen zeigten sich bei allen Patienten. Dieses Ergebnis deckt sich mit den Daten von Holt. Gegenüber den DM2-Patienten mit einem „typisch“ expandierten Repeat (> 75 CCTGs) war die Anzahl der Kern-Foci-Übereinstimmungen jedoch reduziert. Dies lässt sich durch die kürzere Repeat-Expansion erklären. Patient Nr. 6 wies eine erhöhte Anzahl an Foci tragenden Zellkernen, ähnlich einer Vollmutation auf. Dieses Ergebnis hatte sich auch in den molekulargenetischen Unter-

suchungsverfahren bestätigt. Von Interesse ist zudem eine Normalkontrolle mit Kern-Foci-Übereinstimmungen, ähnlich denen von DM2-Patienten mit einem „typisch“ expandierten Repeat (> 75 CCTGs). Da dieser Patient gleichzeitig eine auf eine mögliche DM2-Erkrankung hinweisende Anamnese aufweist, war eine inzidentelle Detektion eines DM2-Patienten möglich und bestätigte so die Stärke der Methodik. Um die unspezifische Kernfärbung mit DAPI bei der Immunhistochemie zu berücksichtigen, wurde eine Fluoreszenz in situ Hybridisierung angeschlossen, um die Ergebnisse der Immunhistochemie zu bestätigen und zu spezifizieren. Mittels einer DNA-Sonde gelang bei allen Patienten der Nachweis einer Kern-Foci-Übereinstimmung und damit die direkte Visualisierung der CCTG-Repeats in den Muskelbiopsaten [41]. Äquivalent zu den Ergebnissen der Immunhistochemie war die Anzahl der Zellkerne, in denen positive Foci nachweisbar waren, reduziert im Vergleich zu einer Vollmutation, nicht aber die Anzahl der Foci pro Zellkern. Auch in dieser Untersuchung konnte Patient Nr. 6 als eine Vollmutation identifiziert werden. Diese beiden positiv ausgefallenen und für die Diagnostik der Myotonen Dystrophie Typ 2 allgemein anerkannten Nachweismethoden bestätigen, dass, auch bei einer geringeren Expansion, CCTG-Repeats als ribonukleäre Foci in den Muskelzellkernen akkumulieren und nachweisbar sind.

Eine weitere Folge der CUGBP1-Überexpression bzw. MBNL-Depletion sind Veränderungen in Spleißprozessen verschiedener, strangabwärts lokalisierter, Gene [30, 31]. Untersucht wurde bei den Patienten, ob ein Spleißing-Defekt in der mRNA, hier des Chloridkanals (CLCN1), vorliegt, wie bei Patienten mit einer klassischen DM2 bekannt ist. Mittels Splicing assay konnte bei allen untersuchten Patienten ein aberrant gespleißtes CLCN1-Transkript nachgewiesen werden.

Ein aberrant gespleißter Chloridkanal in der Muskelfaser führt phänotypisch zu einer Myotonie, d. h. zu einer vermehrten Steifigkeit und Störung der Relaxierung der Muskulatur. Phänotypisch sind alle Patienten auffällig. Sie weisen die für die Myotone Dystrophie Typ 2 typischen Hauptsymptome auf und in unterschiedlichem Ausprägungsgrad multisystemische Manifestationen (z. B. Diabetes mellitus, Katarakt; siehe IV. Phänotypbeschreibung). Diese Klinik deckt sich mit zahlreich in der Literatur beschriebenen Symptomen der DM2, wie unter anderem von Ricker [16] und Day [20] beschrieben und würde die von Schara und Schoser [11] formulierte These unterstützen, dass kein Zusammenhang zwischen der Repeat-Länge und der Schwere der Erkrankung besteht [9], und somit auch bereits geringere CCTG-Repeat-Expansionen eine Klinik hervorrufen können. Neben dem molekulargenetischen Nachweis ließ sich somit eine Korrelation zwischen Genotyp und Phänotyp herstellen.

Das durchschnittliche Erkrankungsalter der Patienten lag zwischen dem 40. und 70. Lebensjahr, der Schwerpunkt um das 58. Lebensjahr ($STD \pm 15,06$). Diese Daten decken sich mit dem für klassische DM2-Patienten beschriebenen Erkrankungsalter [2]. Allerdings muss v. a. zu Beginn der Erkrankung die teilweise recht milde Oligosymptomatik berücksichtigt werden, die die Diagnosefindung erschweren und verzögern kann. Die Familienanamnese ist bei fünf Patienten positiv.

Die für die Myotone Dystrophie Typ 2 klassischen Diagnosemöglichkeiten konnten auch bei den DM2-Patienten mit „kurzem Repeat“ erfolgreich angewendet werden und umfangreich beweisen, dass ein abnorm expandiertes Tetranukleotid-CCTG-Repeat im Intron 1 des Zinkfinger-9-Gens (ZNF-9) auf Chromosom 3q21.3 vorliegt, welches auch klinisch eine DM2 hervorrufen kann. In der Schlussfolgerung sind daher nach dieser vorliegenden Untersuchung auch kurze CCTG-Repeats pathogen.

VIII. Zusammenfassung

Die Myotone Dystrophie Typ 2 (DM2) gehört, zusammen mit der Myotonen Dystrophie Typ 1 (DM1), zu den häufigsten erblichen Muskelerkrankungen des Erwachsenenalters. Sie wird autosomal dominant vererbt, ihre Inzidenz liegt bei 1:10.000 - 1:20.000. Die genetische Ursache der Myotonen Dystrophie Typ 2 ist ein abnorm expandiertes Tetranukleotid-CCTG-Repeat im Intron 1 des Zinkfinger-9-Gens (ZNF-9) auf Chromosom 3q21.3. Das kleinste, bisher in der Literatur beschriebene, Krankheitsallel zeigte eine Expansion von 75 CCTGs. Im Regelfall haben DM2-Patienten ein expandiertes Allel mit mehr als 5000 CCTG-Repeats. Die CCTG-Repeats akkumulieren in sog. ribonukleären Foci im Zellkern und im Zytoplasma. Dadurch kommt es zu Störungen in RNA-Prozessierungs- und Metabolisierungsvorgängen, wie dem alternativen Spleißen oder der Proteintranslation.

Die vorliegende Arbeit beschreibt zum ersten Mal eine Phänotyp-Genotyp-Analyse von DM2-Patienten mit einem Repeat, kürzer als 75 CCTGs, sowie die Evaluation der Pathogenität dieser kurzen Repeats.

Die Evaluation der Pathogenität geschah mithilfe verschiedener Nachweismethoden in Muskelbiopsaten und in der genomischen DNA. Der Repeat-Nachweis im Muskelbiopsat wurde einerseits immunhistochemisch mit monoklonalen Antikörpern gegen das CUG Bindungsprotein 1 (CUGBP1) und gegen die Muscleblind-like Proteine 1-3 (MBNL1-3) geführt, andererseits mittels der Fluoreszenz in situ Hybridisierungstechnik unter Verwendung einer DNA-Sonde. Zur spezifischeren Detektion, der für die DM2-Erkrankung typischen Repeat-Expansion, wurde eine PCR und eine Triplet-Repeat-Primed PCR angeschlossen. Des Weiteren fand eine Sequenzierung der Blutproben der Patienten statt, zur möglichst genauen Analyse der Repeat-Größe.

In der vorliegenden Arbeit konnte der Repeat-Nachweis in den Muskelbiopsaten mit den beschriebenen Methoden bei allen untersuchten Patienten erfolgreich geführt werden. In den PCRs waren erhöhte Produkte nachweisbar. Die angeschlossene TP-PCR zeigte eindeutige Prämutationsmuster und die Sequenzierung der genomischen DNA ergab eine reproduzierbare Repeatlänge zwischen 32 und 36 CCTGs. In der Zusammenschau mit dem erhobenen Phänotyp sind somit bereits CCTG-Repeat-Expansionen unter 75 CCTGs pathogen. Zur funktionellen Absicherung der Pathogenität wurde ergänzend eine Repeat-Untersuchung im Muskel durchgeführt und das für den Pathogenitätsnachweis etablierte CLCN1 splicing assay. Auch hier bestätigte sich die funktionale Relevanz dieser Mini-Repeat-Expansionen.

Somit kann aufgrund der Untersuchungen dieser Arbeit die untere Grenze der als pathogen anzusehenden Repeat-Expansion bei der Myotonen Dystrophie Typ 2 auf eine Repeat-Anzahl von 35 CCTGs festgesetzt werden, die sich mit der von Normalallelen nahezu überlappt.

Daraus ergeben sich bedeutende diagnostische und klinische Konsequenzen für Patienten mit neuromuskulären Erkrankungen und dem Verdacht auf eine Myotone Dystrophie Typ 2.

IX. Literaturverzeichnis

1. Schoser B., Grimm T., Myotone Dystrophien - und ihre Differentialdiagnosen, medgen 2009; 21:381-392. Springer Verlag.
2. Harper PS., Major Problems in neurology, in Myotonic Dystrophy (ed3). Philadelphia, PA, Saunders 2001.
3. Harper PS., Monckton DG., Myotonic dystrophy, in Engel AG., Franzini-Armstrong C. (eds.), Myology (ed3). New York, NY, McGraw Hill Professional, 2004; pp 1039-1076.
4. Steinert H., Myopathologische Beiträge1, Über das klinische und anatomische Bild des Muskelschwunds der Myotoniker. Dtsch. Zeitschr. Nervenheilk. 1909; 37: 58-104.
5. Batten FE., Gibb HP., Myotonia atrophica. Brain. 1909; 32: 187-205.
6. Curschmann H., Myotonische Dystrophie (atrophische Myotonie), in Bumke O, Förster O (eds.), Handbuch der Neurologie. Berlin, Springer Verlag, 1936; pp 465-485.
7. Brook JD., McCurrach ME., Harley HG., Buckler AJ., Church D., Aburatani H., Hunter K., Stanton VP., Thirion JP., Hudson T., et al., Molecular basis of myotonic dystrophy: expansion of a trinucleotide (CTG) repeat at the 3'end of a transcript encoding a protein kinase family member. Cell. 1992 Feb 21; 68(4):799-808.
8. Osborne RJ., Thornton CA., RNA-dominant diseases. Hum Mol Genet. 2006 Oct 15; 15 Spec No 2: R162-9.
9. Liquori CL., Ricker K., Moseley ML., Jacobsen JF., Kress W., Naylor SL., Day JW., Ranum LP, Myotonic dystrophy type 2 caused by a CCTG expansion in intron 1 of ZNF9. Science. 2001 Aug 3; 293(5531): 864-7.
10. Fleischer B., Über myotonische Dystrophie mit Katarakt. Graefen. Arch. Klein. Ophthalmol. 1918; 96: 91-133.
11. Schara U., Schoser B.G., Myotonic dystrophies type 1 and 2: a summary on current aspects. Semin. Pediatr. Neurol. 2006 Jun; 13(2): 71-79.
12. Machuca-Tzili L., Brook D., Hilton-Jones D., Clinical and molecular aspects of the myotonic dystrophies: a review. Muscle Nerve. 2005 Jul; 32(1): 1-18.
13. Mathieu J., De Braekeleer M., Prévost C., Genealogical reconstruction of myotonic dystrophy in the Saguenay-Lac-Saint-Jean area (Quebec, Canada). Neurology. 1990 May; 40(5): 839-42.
14. Mathieu J., Prévost C., Epidemiological surveillance of myotonic dystrophy type 1: a 25-year population-based study. Neuromuscul Disord. 2012 Nov; 22(11): 974-9.
15. Vanier TM., Dystrophia myotonica in childhood. Br. Med J. 1960 Oct 29; 2(5208): 1284-1288.

16. Ricker K., Koch MC., Lehman-Horn F., Pongratz D., Otto M., Heine R., Moxley RT. 3rd, Proximal myotonic myopathy: a new dominant disorder with myotonia, muscle weakness, and cataracts. *Neurology* 1994 Aug; 44(8): 1448-1452.
17. Thornton CA., Griggs RC., Moxley RT 3rd., Myotonic dystrophy with no trinucleotide repeat expansion. *Ann Neurol.* 1994 Mar; 35(3): 269-72.
18. Ranum LP., Rasmussen PF., Benzow KA., Koob MD., Day JW., Genetic mapping of a second myotonic dystrophy locus. *Nat Genet.*, 1998 Jun; 19(2): 196-198.
19. Schneider C., Ziegler A., Ricker K., Grimm T., Kress W., Reimers CD., Meinck H., Reiners K., Toyka KV., Proximal myotonic myopathy: evidence for anticipation in families with linkage to chromosome 3q. *Neurology.* 2000 Aug 8; 55(3): 383-8.
20. Udd B., Meola G., Krahe R., Thornton CA., Ranum L., Day JW., Bassez G., Ricker K., Report of the 115th ENMC workshop: DM2/PROMM and other myotonic dystrophies: 3rd Workshop, 14-16 February 2003, Naarden, The Netherlands. *Neuromuscul Disord.*, 2003 Sep; 13(7-8): 589-596.
21. Day JW., Ricker K., Jacobson JF., Rasmussen LJ., Dick KA., Kress W., Schneider C., Koch MC., Beilman GJ., Harrison AR., Dalton JC., Ranum LP., Myotonic dystrophy type 2: molecular, diagnostic and clinical spectrum. *Neurology.* 2003 Feb 25; 60(4): 657-664.
22. Schoser BG., Ricker K., Schneider-Gold C., Hengstenberg C., Dürre J., Bültmann B., Kress W., Day JW., Ranum LP., Sudden cardiac death in myotonic dystrophy type 2. *Neurology* 2004 Dec 28; 63(12): 2402-2404.
23. Rudnik-Schöneborn S., Schaupp M., Lindner A., Kress W., Schulze-Bahr E., Zumhagen S., Elbracht M., Zerres K., Brugada-like cardiac disease in myotonic dystrophy type 2: report of two unrelated patients. *Eur J Neurol.* 2010 May 18.
24. Kanadia RN., Shin J., Yuan Y., Beattie SG., Wheeler TM., Thornton CA., Swanson MS., Reversal of RNA missplicing and myotonia after muscleblind overexpression in an mouse poly(CUG) model for myotonic dystrophy. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2006 Aug 1; 103(31): 11748-53.
25. Ranum LP., Cooper TA., RNA-mediated neuromuscular disorders. *Annu Rev Neurosci.* 2006; 29: 259-77.
26. Schoser B., Myotone Dystrophien – aktueller Stand der molekularen Pathogenese. *Aktuelle Neurol* 2005; 32: 324-330.
27. Holt I., Mittal S., Furling D., Butler-Browne GS., Brook JD., Morris GE., Defective mRNA in myotonic dystrophy accumulates at the periphery of nuclear splicing speckles. *Genes Cells* 2007 Sep; 12(9): 1035-1048.

28. Schoser BG., Kress W., Walter MC., Halliger-Keller B., Lochmüller H., Ricker K., Homozygosity for CCTG mutation in myotonic dystrophy type 2. *Brain*. 2004 Aug; 127 (Pt 8): 1868-77.
29. Schoser B., Timchenko L., Myotonic dystrophies 1 and 2: complex diseases with complex mechanisms. *Current genomics*. 2010 April; 11(2): 77-90.
30. Llamusi B., Artero R., Molecular Effects of the CTG Repeats in Mutant Dystrophin Myotonic Protein Kinase Gene, *Curr Genomics*. 2008 Dec; 9(8): 509-16.
31. Ranum LP., Day JW., Myotonic dystrophy: RNA pathogenesis comes into focus. *Am J Hum Genet*. 2004 May; 74(5): 793-804.
32. Rassow J., Hauser K., Netzker R., Deutzmann R., *Biochemie, Duale Reihe*. Stuttgart, Georg Thieme Verlag KG 2006; p. 379-380 und p.461-462.
33. Cho DH., Tapscott SJ., Myotonic dystrophy: emerging mechanisms for DM1 and DM2. *Biochim Biophys Acta*. 2007 Feb; 1772(2): 195-204.
34. Salisbury E., Schoser B., Schneider-Gold C., Wang GL., Huichalaf C., Jin B., Sirito M., Sarkar P., Krahe R., Timchenko NA., Timchenko LT., Expression of RNA CCUG repeats dysregulates translation and degradation of proteins in myotonic dystrophy 2 patients. *Am J Pathol*. 2009 Aug; 175(2): 748-62. Epub 2009 Jul 9.
35. Mahadevan MS., Yadava RS., Yu Q., Balijepalli S., Frenzel-McCardell CD., Bourne TD., Phillips LH., Reversible model of RNA toxicity and cardiac conduction defects in myotonic dystrophy. *Nat Genet*. 2006 Sep; 38(9): 1066-70.
36. Ho TH., Bundman D., Armstrong DL., Cooper TA., Transgenic mice expressing CUG-BP1 reproduce splicing mis-regulation observed in myotonic dystrophy. *Hum Mol Genet*. 2005 Jun 1; 14(11): 1539-47.
37. Salisbury E., Sakai K., Schoser B., Huichalaf C., Schneider-Gold C., Nguyen H., Wang GL., Albrecht JH., Timchenko LT., Ectopic expression of cyclin D3 corrects differentiation of DM1 myoblasts through activation of RNA CUG-binding protein, CUGBP1. *Exp Cell Res*. 2008 Jul 1; 314(11-12): 2266-78.
38. Huichalaf C., Schoser B., Schneider-Gold C., Jin B., Sarkar P., Timchenko L., Reduction of the rate of protein translation in patients with myotonic dystrophy 2, *J Neurosci*. 2009 Jul 15; 29(28): 9042-9.
39. Untersuchungsbogen Ludwig-Maximilians-Universität München, Friedrich-Baur-Institut, an der Neurologischen Klinik und Poliklinik, Märkl-Offset.

40. Holt I., Jacquemin V., Fardaei M., Sewry CA., Butler-Browne GS., Furling D., Brook JD., Morris GE., Muscleblind-like proteins: similarities and differences in normal and myotonic dystrophy muscle. *Am J Pathol.* 2009 Jan; 174(1): 216-27.
41. Cardani R., Mancinelli E., Sansone V., Rotondo G., Meola G., Biomolecular identification of (CCTG)_n mutation in myotonic dystrophy type 2 (DM2) by FISH on muscle biopsy, *European Journal of Histochemistry* 2004; Oct-Dec; 48(4): 437-442.
42. Warner JP., Barron LH., Goudie D., Kelly K., Dow D., Fitzpatrick DR., Brock DJ., A general method for the detection of large CAG repeat expansions by fluorescent PCR, *J Med Genet.* 1996 Dec; 33(12): 1022-6.
43. Chen L., Hadd A., Sah S., Filipovic-Sadic S., Krosting J., Sekinger E., Pan R., Hagerman PJ., Stenzel TT., Tassone F., Latham GJ., An information-rich CGG repeat primed PCR that detects the full range of fragile X expanded alleles and minimizes the need for southern blot analysis; *J Mol Diagn.* 2010 Sep; 12(5): 589-600.
44. Bonifazi E., Vallo L., Giardina E., Botta A., Novelli G., A long PCR-Based molecular protocol for detecting normal and expanded ZNF9 alleles in myotonic dystrophy type 2, *Diagn Mol Pathol.* 2004 Sep; 13(3): 164-6.
45. Dalton JC., Ranum LPW., Day JW., Myotonic dystrophy Type 2, in Pagon RA., Bird TD., Dolan CR., Stephens K., Adam MP. (eds.), *GeneReviews™*. Seattle (WA), University of Washington, Seattle, 1993-2006 Sep 21.

X. Appendix

10.1 Abkürzungsverzeichnis

BMD	Becker Muskeldystrophie
BSA	bovine serum albumin
CDM	congenital myotonic dystrophy (kongenitale Myotone Dystrophie)
CCTG	Cytosin Cytosin Thymin Guanin
CLCN1	chloride channel 1 (Chloridkanal 1)
CTG	Cytosin Thymin Guanin
cTNT	cardiale Troponin T (kardiales Troponin T)
CUGBP1	CUG Bindungsprotein 1
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindole
ddNTP	2'-3'-Didesoxynukleotide
DIP	distale Interphalangealgelenke
DM1	Myotone Dystrophie Typ 1
DM2	Myotone Dystrophie Typ 2
DMD	Duchenne Muskeldystrophie
DMPK-Gen	Dystrophia-Myotonica-Proteinkinase-Gen
DMSO	Dimethylsulfoxid
FBS	fetal bovine serum
FISH	Fluoreszenz in situ Hybridisierung
γ -GT	Gamma-Glutamyl-Transferase
GOT	Glutamat-Oxalacetat-Transaminase
GPT	Glutamat-Pyruvat-Transaminase
IBMPFD	inclusion body myopathy associated with Paget disease of the bone and frontotemporal dementia (Einschlusskörpermyopathie assoziiert mit einem M. Paget der Knochen und einer frontotemporalen Demenz)
KG	Kraftgrad
LB	Lysogeny Broth (komplexes Nährmedium)
Lw	Leerwert (Reaktion ohne DNA)
MBNL	Muscleblind-Like (Proteine)
OPMD	okulopharyngeale Muskeldystrophie
PBS	phosphate buffered saline
PIB	proximale Interphalangealgelenke
SAP	Shrimps alkalische Phosphatase
SOB-Medium	Super-Optimal-Broth-Medium (komplexes Nährmedium)
SOC-Medium	SOB-Medium mit dem Zusatz von Glucose 20mM
SSC	saline-sodium citrate buffer
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TOP	terminal oligopyrimidine tract
TP-PCR	Triplet-Repeat-Primed PCR
3'UTR	3'untranslatierter Abschnitt
VCP-Gen	Valosin-Containing-Protein-Gen
ZNF9	Zinkfinger-9-Gen

10.2 Untersuchungsübersicht

Patientennummer	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Anamnese	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Immunhistologie	x	x		x	x	x	x	x	x		
FISH	x	x		x	x	x	x	x	x		
TP-PCR	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
PCR	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	
Klonierung und Sequenzierung		x		x			x		x	x	
Southern Blot	x	x	x	x	x	x	x	x	x		x
CLCN1 splicing assay	x	x		x	x	x	x	x	x		

Tabelle 8 Untersuchungsübersicht

10.3 Schriftliche Einverständniserklärung

Die zu untersuchende genomische DNA aller Patienten war im Friedrich-Baur-Institut, im Medizinisch Genetischen Zentrum München und im Institut für Humangenetik in Würzburg vorhanden. Alle Patienten hatten, nach entsprechender Aufklärung, nach dem aktuellen Genodiagnostik Gesetz, den diagnostischen DNA-Untersuchungen und den diagnostischen Muskelbiopsien schriftlich zugestimmt (written informed consent). Ebenso liegt eine Einverständniserklärung zur Veröffentlichung des Fotos der beiden unter IV. abgebildeten Patienten vor (Abb. 8).

10.4 Danksagung

Ein besonderer Dank geht an meinen Doktorvater, Herrn Prof. Dr. med. B. Schoser, für die Überlassung dieses Dissertationsthemas, die Begeisterung dafür, die Anregungen im praktischen Teil und die Tipps bei der Ausarbeitung, sowie für die Herausforderungen, deren Meistersung mir im Rahmen dieser Arbeit zugetraut wurden.

Herzlich danken möchte ich den Mitarbeiterinnen des myologischen Labors, insbesondere Frau Schmuck, Frau Klutzny, Frau Brandstetter und Frau Grimm für ihre offene und herzliche Aufnahme, sowie für ihre geduldige und großartige Unterstützung bei meiner Arbeit im Labor.

Des Weiteren möchte ich mich bei Frau PD Dr. Angela Abicht aus dem Medizinisch Genetischen Zentrum in München und Herrn Dr. Wolfram Kress aus dem Institut für Humangenetik in Würzburg für die Zusammenarbeit bei der molekulargenetischen Diagnostik bedanken, insbesondere auch bei Frau Halliger-Keller, durch deren Unterstützung ich die Untersuchungen in Würzburg in dieser Form durchführen konnte.

Zuletzt danke ich meiner Familie für ihre Unterstützung, ihre kritische Beurteilung und so manchen Tipp bei der Endredaktion der Arbeit.

10.5 Lebenslauf

10.6 Eidesstattliche Versicherung

Ich erkläre hiermit an Eides statt,
dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

Evaluation der Pathogenität kurzer Repeat-Expansionen im DM2-Genlocus der Myotonen
Dystrophie Typ 2

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und
alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche
kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nach-
gewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnli-
cher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht
wurde.

Ort, Datum

Unterschrift Doktorandin