

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

Identifizierung und Charakterisierung von neuen
Kandidatengenomen bei hereditären Skelettmuskelerkrankungen mit
kardialer Beteiligung

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

vorgelegt von
Madeleine Schuberth
aus Landshut
2014

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. med. Dr. phil. Sabine Krause

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. Wolfgang Müller-Felber
Priv.-Doz. Dr. med. Angela Abicht

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

Tag der mündlichen Prüfung: 31.07.2014

1	Einleitung.....	1
1.1	Myopathien mit kardialer Beteiligung.....	1
1.1.1	Klinik und Genetik der Gliedergürteldystrophie.....	1
1.1.2	Klinik und Genetik der hypertrophen Kardiomyopathie.....	2
1.1.3	Kandidatengen <i>MYBPC3</i>	3
1.1.4	Strukturelle Rolle des MYBPC3 im Sarkomer.....	4
1.1.5	Funktionelle Rolle von MYBPC3 in der Herzmuskelkontraktion.....	5
1.2	Hereditäre Einschlusskörpermyopathie.....	6
1.2.1	Das <i>GNE</i> -Gen.....	6
1.2.1.1	Klinik der GNE-Myopathie.....	6
1.2.1.2	Genetik und Histopathologie.....	7
1.2.2	Das <i>VCP</i> -Gen.....	9
1.2.2.1	Klinik der IBMPFD.....	9
1.2.2.2	Genetik und Histopathologie.....	10
1.2.2.3	Kandidatengen <i>HDAC6</i>	11
2	Problemstellung.....	13
3	Materialien und Methoden.....	15
3.1	Patienten und Untersuchungsmaterial.....	15
3.2	Chemikalien.....	15
3.3	Molekulargenetische Methoden.....	16
3.3.1	DNA-Extraktion.....	16
3.3.2	Polymerase-Kettenreaktion.....	16
3.3.2.1	Prinzip der PCR.....	16
3.3.2.2	Reaktionsbedingungen.....	16
3.3.2.3	PCR-Primer.....	17
3.3.2.4	Optimierungsmöglichkeiten.....	18
3.3.3	Agarose-Gelelektrophorese und Gelextraktion.....	18
3.3.4	Sequenzanalyse.....	19
3.4	Next-Generation-Sequencing.....	20
3.5	Mikrobiologische Methoden.....	21
3.5.1	Klonierung.....	21
3.5.2	Ligation.....	21
3.5.3	Bakterienkultur.....	22
3.5.4	Transformation von Plasmid-DNA in <i>E. coli</i>	22
3.5.5	Plasmid-DNA Isolierung aus Bakterien.....	22
3.6	Zellkultur.....	23
3.6.1	Transfektion.....	23

3.6.2	Färbung und Immunfluoreszenz	23
3.7	Proteinchemische Methoden	24
3.7.1	Probenaufbereitung für Western-Blot und Proteinbestimmung	24
3.7.2	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	25
3.7.3	Western-Blot	26
4	Ergebnisse	28
4.1	Analyse des <i>MYBPC3</i> -Gens	28
4.1.1	Analyse der Indexfamilie	28
4.1.1.1	Klinische Daten	28
4.1.1.2	Genetik des Indexpatienten IV, 2 und der Schwester IV, 1	30
4.1.1.3	Bioinformatische Auswertung des Next-Generation-Sequencing ...	32
4.1.2	Auswahl und molekulargenetische Analyse weiterer Patientenkollektive	40
4.2	Analyse des <i>GNE</i> -Gens	47
4.2.1	Patient 1: Die homozygote Mutation p.I587T	47
4.2.1.1	Klinische Daten des Patienten 1	47
4.2.1.2	Mutationsanalyse	48
4.2.2	Patient 2: Zusammengesetzt heterozygote Mutationen p.R246W und p.I587T	49
4.2.2.1	Klinische Daten des Patienten 2	49
4.2.2.2	Mutationsanalyse	51
4.2.3	Proteinexpression des <i>GNE</i> -Gens in transient transfizierten Zellen	52
4.2.3.1	<i>GNE</i> im pLXSN-Vektor	53
4.2.3.2	<i>GNE</i> in neuen Vektoren: pCMV-myc und pCMV-HA	56
4.2.4	Subzelluläre Lokalisation von <i>GNE</i> in der Zelle	59
4.3	Analyse des <i>HDAC6</i> -Gens	60
4.3.1	Auswahl des Patientenkollektivs	60
4.3.2	Ergebnisse der molekulargenetischen Untersuchungen im <i>HDAC6</i> -Gen	62
4.3.2.1	Polymorphismus IVS3-10delT	62
4.3.2.2	Polymorphismus IVS19-72delAA	63
5	Diskussion	64
5.1	Das <i>MYBPC3</i> -Gen in der neuromuskulären Diagnostik	64
5.1.1	Genotyp-Phänotyp-Korrelation der Indexpatienten	64
5.1.2	Next-Generation-Sequencing zur Analyse von Kandidatengenen	64
5.1.3	Vergleich von neuromuskulären (LGMD-) und kardiologischen (HOCM-) Patientenkollektiven	66
5.1.4	Bedeutung der Sequenzvariante	67

5.1.5	Klinische Relevanz der genetischen Analyse	68
5.2	Einordnung der molekulargenetischen und zellbiologischen Untersuchung des <i>GNE</i> -Gens	70
5.2.1	Mutationen im <i>GNE</i> -Gen.....	70
5.2.1.1	Phänotyp-Genotyp-Korrelation der betroffenen Patienten 1 und 2.	70
5.2.1.2	Bedeutung der Ethnizität und Häufigkeit in Bevölkerungsgruppen.	72
5.2.1.3	Stellenwert der genetischen Diagnostik	72
5.2.1.4	Therapeutische Ansatzmöglichkeiten.....	73
5.2.2	Proteinexpression und subzelluläre Lokalisation von <i>GNE</i> in der Zelle	75
5.3	Rolle des Kandidatengens <i>HDAC6</i> bei der Entstehung neurodegenerativer Erkrankungen.....	75
5.3.1	Assoziation von <i>HDAC6</i> mit <i>VCP</i> beim Proteinabbau.....	75
5.3.2	Phänotypischer Vergleich der Patientenkollektive	76
5.3.3	Bedeutung der Polymorphismen.....	76
5.3.4	Interpretation der <i>HDAC6</i> -Genanalysen	77
6	Literaturverzeichnis	80
7	Anhang.....	87
7.1	Abkürzungsverzeichnis.....	87
7.2	Primer-Sequenzen.....	89
7.2.1	<i>GNE</i>	89
7.2.2	<i>VCP</i>	89
7.2.3	<i>HDAC6</i>	90
7.2.4	<i>MYBPC3</i>	90
7.3	Genbank-Zugangsnummern.....	90
7.4	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	91
8	Danksagung	93
9	Eidesstattliche Versicherung	94

ZUSAMMENFASSUNG

Hereditäre Myopathien, insbesondere Gliedergürteldystrophien, sind häufig mit einer begleitenden Kardiomyopathie assoziiert. Bei 15 der 27 bisher bekannten und molekulargenetisch analysierten Gliedergürteldystrophien konnte eine begleitende kardiale Komponente in unterschiedlicher Ausprägung gefunden werden. Dagegen wurde bislang nur unzureichend untersucht, wie häufig Patienten, die primär an einer hereditären Kardiomyopathie leiden, auch eine Skelettmuskelbeteiligung aufweisen, beispielsweise wie oft Patienten mit einer hypertrophen bzw. obstruktiven Kardiomyopathie (HCM oder HOCM) auch eine Gliedergürtelschwäche zeigen.

Bei einer Familie mit einer bekannten familiären Kardiomyopathie konnte eine autosomal-dominante Mutation im *MYBPC3*-Gen gesichert werden. Mutationen in diesem Gen gehören zu den häufigsten genetischen Ursachen einer HCM. Einige schwerer betroffene Familienmitglieder litten zusätzlich an einer Gliedergürteldystrophie. Eine Gesamtexom-Analyse mittels Next-Generation-Sequencing lieferte Hinweise auf Varianten in möglichen weiteren Kandidatengenen, die die Schwere des Phänotyps erklären könnte. Alternativ wurde die Hypothese überprüft, ob Mutationen im *MYBPC3*-Gen neben ihrer bekannten Rolle als Ursache von Kardiomyopathien auch an der Entstehung von Gliedergürtelmuskelschwäche beteiligt sein könnten. Ein repräsentatives Patientenkollektiv wurde sowohl von neurologischer als auch von kardiologischer Seite ausgewählt, um eine klinische Kombination der Erkrankungen teilweise bestätigt zu finden.

In einem kleinen Kollektiv von sieben Patienten mit einer hereditären hypertrophen (obstruktiven) Kardiomyopathie und verschiedenen Mutation im *MYBPC3*-Gen wurde bei drei Patienten eine bisher nicht diagnostizierte leichtgradige Muskelschwäche bestätigt, was die Möglichkeit einer Assoziation eines Gliedergürtelphänotyps und einer hereditären hypertrophen (obstruktiven) Kardiomyopathie mit Mutationen im *MYBPC3*-Gen nahelegte.

Um zu überprüfen, ob *MYBPC3*-Genvarianten eine bisher übersehene Ursache erblicher Skelettmuskelerkrankungen sind, wurde ein Kollektiv von 59 Patienten mit dem klinischen Phänotyp einer Gliedergürteldystrophie, einem dystrophen Bild in der Muskelhistologie und positiver Familienanamnese ausgewählt, mit bislang aber negativer genetischer Testung in einer Reihe von bekannten LGMD-Genen. Eine

molekulargenetische Analyse aller kodierenden Exons des *MYBPC3*-Gens lieferte jedoch keine pathogene Sequenzvariante.

Auch bei einer anderen erblichen Myopathie, die als GNE-Myopathie oder hereditäre Einschlusskörpermyopathie bezeichnet wird, da sie durch Mutationen im *GNE*-Gen bedingt ist und muskelbiologisch charakteristische Einschlusskörper aufweist, ist neben der Skelettmuskelerkrankung auch eine kardiale Beteiligung beschrieben worden, die zwar selten auftritt, aber zu infausten Prognosen führen kann. Die GNE-Myopathie wird autosomal-rezessiv vererbt und präsentiert sich klinisch mit einer distal betonten und im weiteren Verlauf nach proximal fortschreitender Muskelschwäche, die eine typische Aussparung des M. quadriceps femoris zeigt.

In der vorliegenden Arbeit wurde das *GNE*-Gen bei 20 klinisch ausführlich charakterisierten Patienten molekulargenetisch analysiert, mit dem Ziel, das bisher beschriebene Spektrum an bekannten Mutationen zu erweitern. Bei zwei Patienten konnten bereits publizierte Mutationen gefunden werden, wovon eine auch mit einem kardialen Phänotyp assoziiert wird.

Die zusätzlich durchgeführte Proteinexpressions- und Lokalisationsdiagnostik von GNE in der Zelle mittels Western-Blot und Immunfluoreszenzmikroskopie sollte Aufschluss über die genaue Lokalisation und Funktion von GNE erbringen, um die Pathogenesemechanismen genauer zu verstehen und dadurch zielgerichtet therapeutische Strategien entwickeln zu können.

Eine Einschlusskörpermyopathie findet sich ebenfalls bei der sehr seltenen hereditären IBMPFD, bei der es sich um einen Symptomenkomplex aus Einschlusskörpermyopathie (inclusion body myopathy, IBM), frontotemporaler Demenz und M. Paget des Knochens handelt, der durch Mutationen im *VCP*-Gen bedingt ist. Bei der IBMPFD wurden bislang weltweit 19 verschiedene Mutationen in 38 Familien gefunden. Die Erkrankung kann sich häufig auch klinisch oligosymptomatisch manifestieren, d. h. nur mit einer Myopathie. In einem Patientenkollektiv mit passendem Phänotyp ohne Nachweis einer Mutation im *VCP*-Gen, wurde die Analyse eines neuen, vielversprechenden Kandidatengens etabliert. Das *HDAC6*-Gen kodiert für ein gleichnamiges Protein, das durch die Interaktion mit VCP beim Abbau fehlgefalteter Proteine identifiziert wurde und an der Aggresombildung beteiligt ist. Somit wurden Patienten mit einem IBM- oder IBMPFD-Phänotyp und negativer genetischer Testung im *VCP*-Gen einer *HDAC6*-

Genanalyse unterzogen. Eine pathogene Sequenzvariante ließ sich dabei jedoch nicht detektieren.

Künftig werden neue Technologien wie die Gesamtexom-Sequenzierung die aufwändige Kandidatengenanalyse ablösen, um bei neuromuskulären Erkrankungen Mutationen in neuen oder bekannten Genen zu identifizieren, die wesentliche Erkenntnisse zur Genotyp-Phänotyp-Korrelation liefern.

1 EINLEITUNG

1.1 Myopathien mit kardialer Beteiligung

Kardiale Pathologien sind eine häufige klinische Manifestation bei neuromuskulären Erkrankungen, insbesondere bei Muskeldystrophien. Die kardiale Beteiligung muss nicht zwangsläufig im selben Ausmaß wie die Muskelschwäche auftreten, sie kann aber, abhängig von der Muskeldystrophie, auch vorherrschendes Symptom sein.

1.1.1 Klinik und Genetik der Gliedergürteldystrophie

Bei den Gliedergürteldystrophien (limb-girdle muscular dystrophies, LGMD) zeigt sich zwar vor allem eine Beteiligung der Muskulatur des Becken- und Schultergürtels, aber es konnte in über der Hälfte der berichteten Fälle auch eine kardiale Komponente gefunden werden. Bislang sind 8 autosomal-dominante (LGMD1A bis LGMD1H) und 19 autosomal-rezessive Formen (LGMD2A bis LGMD2S) beschrieben worden, wobei die dominante Vererbung meist seltener auftritt und mit einem milderem klinischen Verlauf korreliert ist.

Tabelle 1 zeigt eine Übersicht über die bisher bekannten Gliedergürteldystrophien mit ihrer molekulargenetischen Grundlage und den klinischen Symptomen der Patienten.

Krankheit	Genlocus	Protein	Alter bei Krankheitsbeginn	Progression	Kardiomyopathie	Kreatinkinase
<i>autosomal dominant</i>						
LGMD1A	5q31.2	Myotilin	>35	langsam	nicht beobachtet	3-4X
LGMD1B	1q11-21	Lamin A/C	4-38	langsam	oft	1-6X
LGMD1C	3p25.3	Caveolin 3	0-12	langsam/moderat	häufig	10X
LGMD1D	7q36	DNAJB6	>35	langsam	nicht beobachtet	1-3X
LGMD1E	2q35	Desmin	>35	langsam	oft	2-4X
LGMD1F	7q32.1-32.2	Transportin 3	1-58	schnell	nicht beobachtet	1-3X
LGMD1G	4q21	unbekannt	>35	langsam	nicht beobachtet	1-9X
LGMD1H	3p23-25.1	unbekannt	10-50	langsam	nicht beobachtet	1-10X
<i>autosomal rezessiv</i>						
LGMD2A	15q15	Calpain 3	13-17	moderat/schnell	selten	3-20X
LGMD2B	2p13.2	Dysferlin	18-35	langsam	möglich	5-40X
LGMD2C	13q12	γ-Sarcoglykan	0-8	schnell	oft	10-70X
LGMD2D	17q21.33	α-Sarcoglykan	0-8	schnell	selten	10-70X
LGMD2E	4q12	β-Sarcoglykan	0-8	schnell	oft	10-70X
LGMD2F	5q33	δ-Sarcoglykan	0-8	schnell	oft	10-70X
LGMD2G	17q12	Telethonin	13-17	langsam	ja	10X
LGMD2H	9q33.1	TRIM32	>35	langsam	nicht beobachtet	5-15X
LGMD2I	19q13.3	FKRP	9-12	moderat	ja	10-20X
LGMD2J	2q24.3	Titin	18-35	fulminant	nicht beobachtet	10-40X
LGMD2K	9q34.1	POMT1	0-12	langsam	nicht beobachtet	10-40X
LGMD2L	11p13-p12	Anoctamin 5	variabel	langsam	nicht beobachtet	1-15X
LGMD2M	9q31	Fukutin	0-8	moderat	manchmal	10-70X
LGMD2N	14q24	POMT2	0-8	langsam	selten	5-15X
LGMD2O	1p34.1	POMGNT1	9-12	moderat	nicht beobachtet	2-10X
LGMD2P	3p21	Dystroglycan	0-8	moderat	nicht beobachtet	20X
LGMD2Q	8q24.3	Plectin1f	0-8	moderat	nicht beobachtet	30X
LGMD2R	2q35-q36.3	Desmin	15-30	moderat	möglich	5-15X
LGMD2S	4q35.1	TRAPPC11	0-12	moderat	selten	2-18X

Tabelle 1: Übersicht über die Gliedergürteldystrophien Tabelle modifiziert nach Nigro et al., 2011 und OMIM (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim>, 2014).

1.1.2 Klinik und Genetik der hypertrophen Kardiomyopathie

Mit einer Prävalenz von 1:500 ist die hypertrophe Kardiomyopathie die häufigste hereditäre Herzerkrankung, die vor allem bei jungen Sportlern die häufigste Form des plötzlichen Herztods darstellt (Maron, Gardin et al. 1995). Klinisch zeigt sich ein sehr heterogenes Bild, das von relativer Symptomfreiheit bis hin zur Pumpfunktionsstörung

und Herzinsuffizienz mit Belastungsdyspnoe, pektanginösen Beschwerden und Arrhythmien reicht. Strukturell liegt der hypertrophen Kardiomyopathie eine linksventrikuläre Hypertrophie (LVH) mit vorherrschender Beteiligung des interventrikulären Septums zugrunde, bei der es zu einer Verlegung der linksventrikulären Ausflussbahn kommen kann. Man unterscheidet deshalb obstruktive (HOCM) und nicht obstruktive Formen (HCM). Histologisch zeigt sich ein Verlust der regelmäßigen Anordnung der Kardiomyozyten, der als sogenannter disarray bezeichnet wird und zu einem Verlust der gap junctions zwischen den Zellen führt. Somit kann die Störung der Erregungsleitung im Ventrikelmyokard erklärt werden (Richardson, McKenna et al. 1996).

Die HCM wird v. a. durch autosomal-dominant vererbte Mutationen in Genen verursacht, die für myofilamentäre Proteine kodieren. In den letzten 20 Jahren wurden mehr als 450 davon gefunden, wobei Mutationen im Gen des Myosin-bindenden Protein C (*MYBPC*), im kardialen Troponin T (*TNNT2*) und in der schweren Kette des kardialen β -Myosins (*MYH7*) am häufigsten sind (Carrier, Schlossarek et al. 2010).

1.1.3 Kandidatengen *MYBPC3*

Das Myosin-bindende Protein C (*MYBPC*) ist bereits seit den 70er Jahren als Muskelprotein bekannt (Starr and Offer 1971) und das Verständnis seiner strukturellen und funktionellen Rolle im Herzen ist von enormem klinischen Interesse seit entdeckt wurde, dass Mutationen im *MYBPC3*-Gen zu hypertrophen Kardiomyopathien führen. Das Protein existiert in drei Isoformen: zwei Gene werden im Skelettmuskel exprimiert, *slow skeletal MYBPC1* allein in Typ I Fasern, *fast skeletal MYBPC2* in Typ II Fasern in Ko-Expression mit *MYBPC1* (Gautel, Furst et al. 1998) und eines im Herzmuskel (*cardiac MyBPC* bzw. *MYBPC3*). Dabei handelt es sich nicht um Produkte alternativen Spleißens, da jede Isoform durch ein unterschiedliches Gen auf einem unterschiedlichen Chromosom (Chromosom 12, 19, 11) kodiert wird (Yamamoto and Moos 1983).

MYBPC3 ist eine Komponente des dicken Anteils der Myofibrillen und ist in der C-Region der A-Bande, also in der Myosin-Aktin-Interaktionszone des Sarkomers, lokalisiert. In dieser Region, in der die für die Kontraktion des Muskels essentielle Querbrückenbindung stattfindet, bildet *MYBPC3* 7 bis 9 transversale Streifen, die jeweils im Abstand von 43 nm zueinander angeordnet sind (Luther, Bennett et al. 2008).

Die genaue Funktion von MYBPC3 ist bis heute noch nicht gänzlich geklärt (Oakley, Hambly et al. 2004), wobei vermutet wird, dass es sowohl strukturelle als auch regulatorische Aufgaben im kardialen Sarkomer übernimmt. Eine aberrante Expression der kardialen Isoform MYBPC3 im Skelettmuskel wurde im Rahmen einer hereditären Myopathie beschrieben (Tajsharghi, Leren et al. 2010).

1.1.4 Strukturelle Rolle des MYBPC3 im Sarkomer

MYBPC3 ist ein intrazelluläres Mitglied der Immunglobulin-Superfamilie, die durch eine ähnliche Domänen-Architektur charakterisiert ist. Die MYBPC3-Grundstruktur besteht aus einer Abfolge von Immunglobulin C2 (Ig)- und Fibronectin Typ III-Domänen (FnIII) (siehe Abbildung 1). Die kardiale Isoform zeichnet sich durch drei spezifische Regionen aus, die man in den skelettmuskulären Formen nicht antrifft: Zum einen befindet sich am N-terminalen Ende der kardialen Isoform eine zusätzliche IgC2-Domäne (C0) (Yasuda, Koshida et al. 1995). Zum anderen weist das Verbindungsstück, das als sog. Linker oder MYBPC-Motiv bezeichnet wird, zwischen C1 und C2 in der kardialen Form vier Phosphorylierungsstellen auf (Ser275-Ser284-Ser304-Ser311), die über unterschiedliche Mechanismen phosphoryliert werden können. Als letztes Unterscheidungsmerkmal zwischen der skelettmuskulären und der kardialen Isoform, besitzt letztere an der C5-Domäne eine 28 Aminosäuren umfassende Schleife. Es wird vermutet, dass dieser Prolin-reiche Abschnitt ebenfalls an einer herzeigenen, MYBPC3-Kinase-Bindung beteiligt ist (Gautel, Zuffardi et al. 1995).

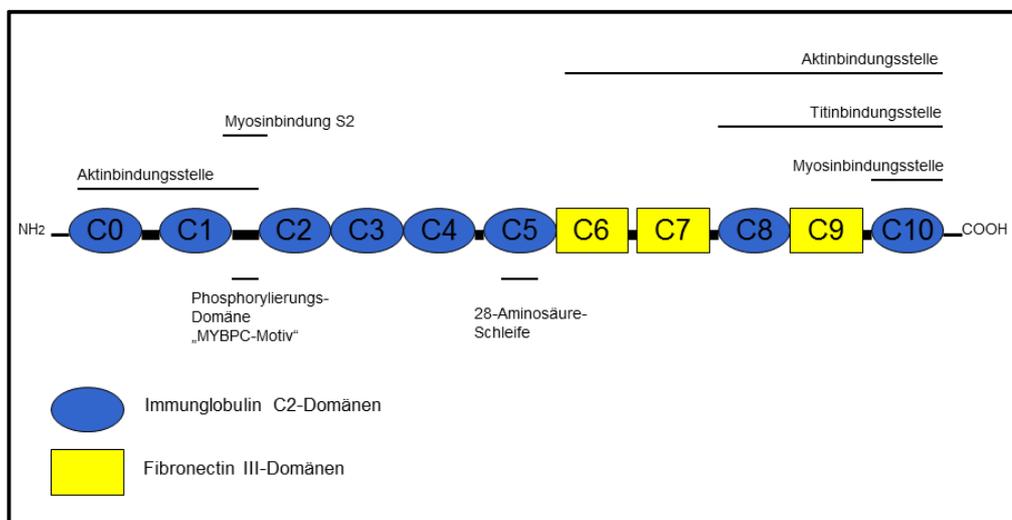


Abbildung 1: Schematische Abbildung des MYBPC3-Gens Waagrechte Striche stellen die möglichen Bindungsbereiche zu anderen Strukturproteinen dar; Abbildung modifiziert nach Oakley et al. 2004.

während der Diastole und hält dadurch eine effiziente kardiale Kraft und Kinetik aufrecht. Bestätigt wird dies durch die Tatsache, dass geringe oder zum Teil auch komplett fehlende Phosphorylierung von MYBPC3 bei hypertropher Kardiomyopathie und Herzinsuffizienz gefunden wurde (Harris, Bartley et al. 2002).

1.2 Hereditäre Einschlusskörpermyopathie

Die Einschlusskörpermyositis (inclusion body myositis, IBM) wurde erstmals im Jahre 1971 von Yunis und Samaha beschrieben (Yunis and Samaha 1971) und erhielt ihren Namen wegen der charakteristischen Einschlusskörper, die sich in Form von Tubulofilamenten und Vakuolen mit eosinophilen zytoplasmatischen Einschlüssen im Muskel zeigen.

Morphologisch und klinisch wird die sporadische Form (sIBM) mit charakteristischen Entzündungszeichen von der selteneren hereditären Form (hIBM) unterschieden, die sich durch familiäre Vererbung und in der Regel ohne Muskelentzündung auszeichnet. Daneben existiert ein Symptomkomplex aus Einschlusskörpermyositis, frontotemporaler Demenz und Morbus Paget, welcher als IBMPFD abgekürzt wird.

1.2.1 Das GNE-Gen

1.2.1.1 Klinik der GNE-Myopathie

Die GNE-Myopathie (hIBM oder IBM2, OMIM#600737) wird autosomal-rezessiv vererbt und auch als Quadriceps Sparing Myopathy bezeichnet, weil im klinischen Krankheitsbild zwar die Muskulatur der unteren Extremität betroffen ist, der M. quadriceps femoris aber weitgehend von der Atrophie ausgespart bleibt.

Im Japanischen Raum hat parallel dazu Nonaka ein phänotypisch sehr ähnliches Krankheitsbild beschrieben und dieses als Distal Myopathy with Rimmed Vacuoles (DMRV) oder Nonaka Myopathy (OMIM#605820) bezeichnet (Nonaka, Sunohara et al. 1981).

Die Erkrankung wurde vor allem bei Juden persischer Herkunft im Iran und Mittleren Osten beschrieben (Argov and Yarom 1984), mittlerweile sind jedoch Betroffene weltweit identifiziert worden.

Klinisch manifestiert sich die GNE-Myopathie im Alter zwischen 15 bis 40 Jahren durch eine progrediente Muskelschwäche vor allem der unteren Extremität mit besonderer

Ausprägung im anterioren Kompartiment, sodass der M. tibialis anterior meist stark betroffen ist und sehr früh im Verlauf eine charakteristische Fußheberparese auftritt. Typischerweise ist der M. quadriceps femoris teilweise oder komplett ausgespart, meist auch noch in den fortgeschrittenen Jahren der Erkrankung, wodurch den Patienten sehr lange ihre Gehfähigkeit, wenn auch mit Schwierigkeiten und Einschränkungen, erhalten bleibt (Sivakumar and Dalakas 1996). Somit werden sie erst im sehr späten Verlauf der Erkrankung rollstuhlpflichtig. Die Muskelschwäche schreitet im weiteren Verlauf weiter nach proximal fort, sodass auch die Muskeln an Schultergürtel, Rumpf und Arm beteiligt sein können, wobei hier die Ausprägung nicht so stark ist wie an der unteren Extremität. Die Muskulatur der Augen, des Pharynx und des Respirationstrakt bleibt im gesamten Verlauf der GNE-Myopathie unbeteiligt; ebenso wie auch Kognition, Koordination, Sensibilität und die Hirnnervenfunktion keinen pathologischen Befund liefern. Auch wenn eine kardiale Beteiligung bei der GNE-Myopathie nicht so häufig und charakteristisch wie bei einer Gliedergürteldystrophie sind, zeigte sich bei 18% einer kleinen japanischer Patientenkohorte mit einer schweren Ausprägung der Muskelatrophie auch eine kardiale Beteiligung unterschiedlicher Schwere, die zum Teil auch im plötzlichen Herztod mündete (Nishino, Malicdan et al. 2005). Auch bei einem kaukasischen Geschwisterpaar konnte im Jahr 2011 eine Kombination aus Skelett- und Herzmuskelschwäche gefunden werden (Chai, Bertorini et al. 2011).

Diagnostisch findet sich neben den oben erwähnten Auffälligkeiten in der Muskelbiopsie, laborchemisch die Kreatinkinase im Serum im Normbereich oder leicht erhöht (Argov and Yarom 1984). Das EMG zeigt meist nur unspezifische Signale im Sinne einer myopathischen Veränderung. Im MRT der betroffenen Muskelgruppen lässt sich eine Umwandlung der Muskulatur zu Binde- und Fettgewebe darstellen.

1.2.1.2 Genetik und Histopathologie

Patienten, die an einer GNE-Myopathie leiden, weisen homozygote oder zusammengesetzt heterozygote Mutationen im *GNE*-Gen auf, das für das bifunktionale Enzym UDP-*N*-Acetylglucosamin (UDP-GlcNAc)-2-Epimerase - *N*-Acetylmannosamin (ManNAc)-Kinase kodiert (Eisenberg, Avidan et al. 2001). Bisher kennt man 82 Mutationen (<http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/gene.php?gene=GNE>, 2014).

Das Enzym katalysiert die ersten zwei geschwindigkeitsbestimmenden Schritte in der Biosynthese der Sialinsäure, die Glykoproteine und -lipide in der Zellmembran

modifiziert und zusätzlich eine essentielle Rolle in der Zelladhäsion und Signaltransduktion spielt. Es wird vermutet, dass sowohl die Faltung bzw. Stabilisierung als auch die eigentliche Funktion der Glykoproteine in den Skelettmuskeln nur mit einer regelrechten Sialylierung möglich ist. Da eine Mutation im *GNE*-Gen möglicherweise zu einer verminderten Sialinsäurebiosynthese führt, kann dies die Ursache für die myofibrilläre Degeneration und eingeschränkte Muskelfunktion bei Patienten mit GNE-Myopathie darstellen, auch wenn die exakten zellulären Mechanismen bislang noch unklar sind.

Neben der Hyposialylierung existieren noch andere Hypothesen, die versuchen, die Pathologie einer *GNE*-Mutation zu erklären. Diese schließen auch eine mögliche subzelluläre Fehllokalisierung von *GNE* in der Zelle ein, wobei das Vorhandensein von *GNE* im Golgi-Apparat gut mit seiner Rolle in der Sialinsäurebiosynthese erklärt werden kann; eine mögliche Funktion im Nukleus aber unklar bleibt. Möglich wäre, dass *GNE* als nukleozytoplasmatisches Shuttleprotein fungiert und somit enzymatische Aktivitäten in der Zelle reguliert (Krause, Hinderlich et al. 2005).

Zusätzlich zeigte sich, dass *GNE*, unabhängig von der Sialinsäureproduktion, eine Kontrollfunktion in zellulären Signalwegen, der Gangliosid-Expression und der Modulation von Proliferation und Apoptose haben könnte (Wang, Sun et al. 2006). In einer anderen Studie wurde ebenfalls die Rolle von *GNE* bei der Apoptose diskutiert und eine veränderte Übertragung des Apoptosesignals in primären Myoblasten von Patienten mit GNE-Myopathie gefunden (Amsili, Shlomei et al. 2007). Mitochondriale Prozesse können in GNE-Myopathie-Muskeln beeinträchtigt sein, was ebenfalls zu gestörten Apoptosesignalen, aber auch zu einer unzureichenden Energiezufuhr in Form von ATP im betroffenen Muskel führen kann (Eisenberg, Novershtern et al. 2008).

In der Muskelbiopsie von Patienten mit GNE-Myopathie zeigen sich in der Gomori-Trichrom Färbung die namensgebenden roten rimmed vacuoles, die vermutlich Vakuolen mit autophagischer Aktivität darstellen und einen hohen Gehalt an saurer Phosphatase aufweisen (Sadeh, Gadoth et al. 1993). Daneben finden sich die ebenfalls charakteristischen zytoplasmatischen und nukleären Einschlusskörper, die eine Vielzahl an Proteinen aus Abbau- und Degradationsprozessen enthalten, wie z. B. beta-Amyloid oder Prion-Protein (Dalakas 2002). Ultrastrukturell zeigen sich typischerweise zytoplasmatische Tubulofilamente mit einem Durchmesser von 15 bis 18 nm und Mitochondrien mit unregelmäßiger Form und Größe.

1.2.2 Das VCP-Gen

1.2.2.1 Klinik der IBMPFD

Die seltenen Mutationen im Valosin-containing protein Gen (*VCP/p97*, OMIM#605382) werden autosomal-dominant vererbt und verursachen ebenfalls eine Einschlusskörpermyopathie (IBM) zusammen mit einem M. Paget des Knochens (PDB) und einer frontotemporalen Demenz (FTD) (Watts, Wymer et al. 2004).

Betroffene Patienten entwickeln typischerweise zwischen dem 30. und 40. Lebensjahr eine Muskelschwäche, die sich phänotypisch sehr heterogen präsentiert und deshalb oft fehldiagnostiziert wird. Die Patienten zeigen zunächst meist eine proximal betonte Muskelschwäche unter Einbeziehung des Gliedergürtels, die einer Gliedergürteldystrophie (LGMD) bzw. einer fazioscapulohumeralen Dystrophie (FSHD) ähnelt. Das Treppensteigen und/oder die Armelevation über die Horizontale sind den Patienten meist nur mit Einschränkungen möglich. Aus der scapulohumeralen Schwäche resultiert häufig eine charakteristische Scapula alata. Auch eine axiale Kraftlosigkeit mit Kopfeheberparese und Lumballordose kann im weiteren Verlauf auftreten. Eine distale Schwäche der Extremitäten mit diskreten Paresen der kleinen Handmuskeln und Fußheberschwäche ist bei den betroffenen Patienten ebenfalls beschrieben worden (Kimonis, Fulchiero et al. 2008).

Im Gegensatz zur GNE-Myopathie kann bei der IBMPFD auch eine Schwäche der Gesichts-, Zungen- und Atemmuskulatur auftreten, was im späteren Stadium häufig zu respiratorischen Komplikationen bis hin zum Tod führen kann.

Ferner wurde die frontotemporale Demenz mit typischen Verhaltensänderungen wie Verlust des Kurzzeitgedächtnisses, Sprachschwierigkeiten und antisozialem Verhalten bei manchen Betroffenen beobachtet, die durch kortikale degenerative Veränderungen, v. a. im Temporallappen und Hippocampus, verursacht zu sein scheint (Watts, Thomasova et al. 2007).

Der Morbus Paget tritt meist sehr früh im Krankheitsverlauf auf (mittleres Alter ca. 40 Jahre) und zeigt sich bei der IBMPFD an den Prädilektionsstellen Wirbelkörper, Becken und Schädel. Aufgrund der erhöhten Osteoklastentätigkeit kommt es zu einem Anstieg der alkalischen Phosphatase im Serum, die neben der radiologischen Diagnostik auch zu Screeningzwecken verwendet werden kann (Kimonis, Mehta et al. 2008).

Obwohl es sich bei der IBMPFD um eine Erkrankung handelt, die mehrere Organsysteme betreffen kann, ist die Muskelschwäche als führendes Symptom bei ca.

90% der Patienten zu finden und als isoliertes Symptom bei ca. 30% der Betroffenen (Kimonis, Fulchiero et al. 2008). Nur 12% der Patienten weisen das volle Spektrum der Erkrankung auf (Weihl, Pestronk et al. 2009).

1.2.2.2 Genetik und Histopathologie

Diagnostisch weiterführend können bei IBMPDF die verschiedenen Einschlusskörper sein, die die Muskelbiopsie zeigen kann. So finden sich zum einen die sehr prominenten Ubiquitin-positiven und tubulofilamentären Einschlüsse, die v. a. subsarcolemmal als auch in den Zellkernen der Muskelfaser (Askanas and Engel 2006) lokalisiert sind.

Zum anderen stellen sich VCP-positive Aggregate sowohl im Skelettmuskel als auch in den Neuronen des ZNS bei IBMPDF-Patienten dar. In Neuronen sind diese VCP-positiven Einschlüsse ausschließlich im Nucleus zu finden, wohingegen im Skelettmuskel nur über zytoplasmatische Einschlüsse berichtet wurde. Allerdings sind VCP-Aggregate nicht spezifisch für eine IBMPDF und sind bei einer großen Anzahl von neurodegenerativen Erkrankungen beobachtet worden, wie z. B. dem M. Parkinson, der Lewy-Body Erkrankung, der Chorea Huntington oder der Amyotrophen Lateralsklerose (Hubbers, Clemen et al. 2007).

Zusätzlich weisen bestimmte Patienten auch sog. TDP-43 positive Einschlüsse auf, die mit Ubiquitin ko-lokalisiert sein können und sich entweder intraneuronal oder subsarcolemmal bzw. zytoplasmatisch im Skelettmuskel befinden. Die Rolle des TAR DNA-binding protein 43 (TDP-43) ist bisher nicht gänzlich verstanden. Es handelt sich hierbei um ein RNA-bindendes Protein, das alternatives Spleißen von prä-mRNA-Spezies vermittelt. Die Akkumulation von TDP-43 wurde ebenfalls im neuronalen Gewebe von ALS-Patienten gefunden und scheint bei der IBMPDF vor allem an der Pathogenese der Demenz beteiligt zu sein (Neumann, Mackenzie et al. 2007).

VCP gehört zur AAA⁺-Protein Familie (ATPase associated with various activities) und weist eine dreigeteilte Struktur auf: die N-terminale Domäne ist wichtig für Substrat- und Cofaktor-Assoziation, wohingegen das C-terminale Ende in eine zentrale D1- und D2-AAA⁺-Domäne geteilt ist und für ATP-Bindung und Hydrolyse verantwortlich ist (Ju and Weihl 2010). VCP wird ubiquitär exprimiert und nimmt an einer Vielzahl von zellulären Prozessen wie Mitose, Zelltod, Biogenese von Zellorganellen oder Membranfusion teil.

Am wichtigsten aber ist die Rolle von VCP in der Proteindegradation, d. h. beim Abbau von fehlerhaften, geschädigten oder falsch gefalteten Proteinen, die alternative Strukturen ohne biologische Aktivität aufweisen und damit die Zellintegrität belasten. Da VCP aber nicht selbst den Abbau der defekten Proteine übernimmt, ist eine spezielle Adressierung zum Abbau über das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) erforderlich. Hier werden die Proteine, die zum Abbau bestimmt sind, markiert und so zum Proteasom geleitet, wo die eigentliche Zerlegung der Proteine in kleinere Peptide stattfindet. VCP ist mit vielen Akteuren dieses Adressierungssystems, des UPS, assoziiert, z. B. den E3/E4 Ubiquitin-Ligasen, die in einer Enzymkaskade Polyubiquitinketten am Zielprotein aufbauen (Halawani and Latterich 2006).

Einen essentiellen Teil hierbei übernimmt VCP am Endoplasmatischen Retikulum bzw. bei der ERAD (endoplasmic reticulum associated degradation). Normalerweise findet hier die Qualitätskontrolle sekretorischer Proteine statt. Fehlgefaltete oder nicht-assemblierte Proteine werden hier über ein komplexes Korrektur- und Rücktransportverfahren, an dem VCP maßgeblich beteiligt ist, zum 26S-Proteasom zurückgeführt, wo dann der Abbau stattfindet (DeLaBarre, Christianson et al. 2006).

1.2.2.3 Kandidatengen *HDAC6*

Neurodegenerative Erkrankungen sind durch progredienten Verlust spezifischer Funktionen und durch das Absterben von Neuronen in speziellen Arealen des Nervensystems charakterisiert. Dieser Neuronenverlust ist häufig mit dem Auftreten von Proteinaggregaten, fehlregulierter Proteinhomöostase oder mitochondrialer Dysfunktion assoziiert. HDAC6 wurde als ein integraler Bestandteil identifiziert, der mit diesem Stress in der Zelle assoziiert ist.

Die Histon-Deacetylase 6 (HDAC6) ist ein Mitglied der Klasse II-HDAC-Enzyme, das zytoplasmatisch lokalisiert ist und sich am Mikrotubuliorganisationszentrum (MTOC) befindet. Im Gegensatz zu den übrigen Mitgliedern der HDAC-Familie besitzt es eine Duplikation der katalytischen Region und zusätzlich eine Zink-Finger-Domäne, die die Polyubiquitinkette von fehlgefalteten Proteinen binden kann (Yang and Gregoire 2005). HDAC6 nützt damit einen alternativen Abbauweg für Proteine, wenn das UPS überlastet ist, das sog. Aggresom (Kawaguchi, Kovacs et al. 2003). Durch Interaktion von HDAC6 mit dem abzubauenen Protein auf der einen und mit dem Motorprotein Dynein auf der anderen Seite, wird der Transport entlang der Mikrotubuli zum

Aggresom ermöglicht. Dieses Aggresom ist kein statisches Zellkompartiment, sondern stellt eine perinukleäre, Mikrotubuli-assoziierte Struktur dar, die sowohl Ubiquitin-positive als auch aggregierte Proteine enthält. Daneben existieren darin Organellen, die den Abbauprozess durchführen können, wie z. B. proteasomale Untereinheiten und Komponenten mit autophagischer Aktivität. Letztendlich wird das Aggresom von Autophagosomen eingeschlossen, die dann zum Lysosom verschmelzen, worin die Proteine abgebaut werden (Garcia-Mata, Gao et al. 2002).

Daneben zeigte sich, dass HDAC6 mit p97/VCP assoziiert ist und nur ein Gleichgewicht zwischen beiden Partnern bestimmen kann, ob das ubiquitinierte Protein direkt abgebaut oder ein Aggresom gebildet wird (Boyault, Gilquin et al. 2006). VCP fördert auf der einen Seite die Proteasom-vermittelte Degradierung, wohingegen HDAC6 die Bildung von Aggresomen stimuliert, aber auch eine Rolle beim Abbau derjenigen ubiquitinierten Proteine spielt, die unabhängig vom UPS degradiert werden. Daneben reguliert HDAC6 Autophagosom-Reifungsschritte, die von wesentlicher Bedeutung für die Ubiquitin-selektive Qualitätskontroll-Autophagie sind (Lee, Koga et al. 2010). So stellt ein Zusammenspiel der beiden Komponenten VCP und HDAC6 den geordneten Proteinabbau und damit die Proteinqualitätskontrolle sicher.

In Modellorganismen, die eine Überexpression von HDAC6 aufwiesen, war die Toxizität von Proteinaggregaten vermindert und die Proteindegradation durch Autophagie verstärkt, was das Auftreten einer neurodegenerativen Entwicklung verhinderte (Pandey, Nie et al. 2007). Somit kann auch das Auftreten von HDAC6 in Lewy-Bodies erklärt werden, die sich beispielsweise beim M. Parkinson finden.

2 PROBLEMSTELLUNG

Die Diagnostik neuromuskulärer Erkrankungen stellt insbesondere auf Grund des variablen Phänotyps in der klinischen Praxis oft eine schwierige Herausforderung dar, die zu einem hohen Leidensdruck der Patienten führt. Aber auch unter sozioökonomischen Gesichtspunkten ist eine schnelle, zielführende Diagnostik und ein tiefgehendes Verständnis der komplexen Pathogenitätsmechanismen essentiell, um effiziente Therapiestrategien zu entwickeln und langfristige Invalidität zu verhindern.

Da bekannt ist, dass bei einigen Muskeldystrophien auch eine kardiologische Komponente auftreten kann, wurde dieser Gesichtspunkt in der vorliegenden Arbeit besonders berücksichtigt, um eine Überlappung der kardiologischen und neurologischen Krankheitsbilder zu detektieren und somit eine optimale, interdisziplinäre Versorgung der betroffenen Patienten zu ermöglichen. Es sollte zunächst untersucht werden, wie häufig eine muskuläre Beeinträchtigung bei Patienten auftritt, die primär an einer Kardiomyopathie leiden, die aufgrund einer Mutation im Myosin-bindenden Protein C (*MYBPC3*) ausgelöst wurde. Mutationen in diesem Protein stellen mit 20 bis 30% eine der häufigsten Ursachen für genetische Formen der Kardiomyopathie dar und sind somit relativ oft in der kardiologischen Routineversorgung anzutreffen. Die Überprüfung der Hypothese, dass durch *MYBPC3*-Mutationen auch Muskeldystrophien verursacht werden könnten, ist deshalb für viele Patienten von enormer klinischer Relevanz, um eine bestmögliche Versorgung zu erhalten. Gerade bei diesen ohnehin schon durch die Herzmuskelbeteiligung beeinträchtigten Patienten stellt die molekulargenetische Diagnostik eine minimal-invasive und wenig belastende Untersuchungsmethode dar, die zukünftig eine fundierte humangenetische Beratung des Patienten und seiner Familie ermöglicht. Somit könnten auch detailliertere Aussagen über Verlauf, Prognose und Vererbungsmodus getroffen werden. Durch eine frühzeitige Anbindung der Betroffenen an spezialisierte Zentren, kann durch supportive Therapien und regelmäßige kardiologische und neurologische Funktionsdiagnostik die Lebensqualität des Patienten verbessert und ggf. auch die Lebenserwartung verlängert werden.

In einer Familie mit bekanntem kardiogenetischen Befund im *MYBPC3*-Gen fand sich bei einigen Familienmitgliedern noch zusätzlich eine sehr ungewöhnliche schwere skelettmuskuläre Beteiligung. Die Identifizierung und Evaluation zusätzlicher Varianten

in Kandidatengen in dieser Familie mittels Gesamtexom-Sequenzierung war ein Teil der vorliegenden Arbeit.

Da *MYBPC3* auch im Skelettmuskel eine Rolle bei der Regulation der Kontraktion spielen könnte, sollte in einem geeigneten Patientenkollektiv untersucht werden, ob *MYBPC3*-Genvarianten eine bisher nicht identifizierte Ursache erblicher Skelettmuskelerkrankungen sind.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es, bei der autosomal-rezessiven GNE-Myopathie, die ebenfalls mit kardialer Beteiligung auftreten kann und bei der autosomal-dominanten IBMPFD das Spektrum der bekannten klinischen Phänotypen zu erweitern, um eine umfassende Genotyp-Phänotyp-Korrelation zu erreichen. Somit könnte an betroffenen Patienten gezielt eine molekulargenetische Diagnostik durchgeführt werden und anhand eines Vergleichskollektivs mit derselben Mutation eine Aussage über Verlauf und Prognose der Erkrankung getroffen werden. Des Weiteren sollte auch die molekulargenetische Analyse mittels direkter Sequenzierung eines neuen Kandidatengens etabliert werden. Aufgrund bekannter, molekularer Mechanismen wurde die Hypothese aufgestellt, dass Mutationen im *HDAC6*-Gen, das mit VCP beim Proteinabbau interagiert, ursächlich an der Entstehung von hereditären Einschlusskörpermyopathien sein könnten. Dies sollte an einem repräsentativen Patientenkollektiv überprüft werden, das phänotypisch IBMPFD-Patienten ähnelte ohne Mutationsnachweis im *VCP*-Gen.

3 MATERIALIEN UND METHODEN

3.1 Patienten und Untersuchungsmaterial

Insgesamt wurden bei 114 Patienten die einzelnen kodierenden Exons mit flankierenden intronischen Bereichen verschiedener Kandidatengene (*GNE*, *VCP*, *HDAC6*, *MYBPC3*) direkt sequenziert, um Veränderungen in der Basenabfolge und damit in der Aminosäuresequenz zu detektieren, die möglicherweise die Ursache der Erkrankung der Patienten ist. Zusätzlich wurde auch die DNA von nicht erkrankten Personen oder Familienangehörigen von Betroffenen analysiert, um Vergleichsmöglichkeiten zu erhalten.

Die eingeschlossenen Patienten des Friedrich-Baur-Instituts der LMU München wurden nach klinischen Kriterien für molekulargenetische Untersuchungen ausgewählt. Zusätzlich wurde das Kollektiv noch durch Patientenergänzt, bei denen in anderen Kliniken in Deutschland oder im Ausland durch entsprechende klinische Untersuchung die Indikation zu einer molekulargenetischen Untersuchung gestellt wurde, sodass EDTA-Vollblut, genomische DNA oder Muskelgewebe eingeschickt und anschließend sequenziert wurde.

Alle durchgeführten Untersuchungen erfolgten nach ausführlicher Aufklärung und mit schriftlichem Einverständnis der Patienten bzw. deren Familienangehörigen nach Gendiagnostikgesetz GenDG §§ 8, 9.

3.2 Chemikalien

Alle benutzten Chemikalien entsprachen höchsten Reinheitsanforderungen und stammten von Clontech (Mountain View, USA), Dako (Glostrup, Dänemark), Eppendorf (Hamburg, Deutschland), Fermentas (Wilna, Litauen), Invitrogen (Carlsbad, USA), Macherey&Nagel (Düren, Deutschland), Metabion (Martinsried, Deutschland), New England BioLabs (Ipswich, USA), Polyplus-transfection SA (Illkirch, Frankreich), Promega (Fitchburg, USA), Qiagen (Hilden, Deutschland) oder Sigma-Aldrich (München, Deutschland).

3.3 Molekulargenetische Methoden

3.3.1 DNA-Extraktion

Die genomische DNA-Extraktion aus venösem Vollblut, das peripher gewonnen und mit EDTA antikoaguliert wurde, erfolgte nach dem Protokoll von Wizard Genomic Purification Kit (Promega) in drei Schritten nach Angaben des Herstellers. Die so gewonnene DNA wurde bis zur Weiterverwendung bei 4°C im Kühlschrank gelagert.

3.3.2 Polymerase-Kettenreaktion

3.3.2.1 Prinzip der PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction, PCR) stellt ein gängiges Verfahren zur Amplifizierung spezifischer DNA-Sequenzen *in vitro* dar, bei der durch DNA-Replikation in Abhängigkeit von der Anzahl der gewählten Zyklen eine Vervielfältigung der gewünschten DNA-Sequenz um den Faktor 2^{20} bis zu 2^{40} erreicht werden kann (Mullis 1990).

Der Ablauf eines Zyklus gliedert sich in 3 Schritte, die jeweils bei spezifischen Temperaturen eine festgelegte Zeitspanne ablaufen.

Zunächst erfolgte die Denaturierung, bei der die Matrizen-DNA durch eine Temperatur von 95°C in ihre beiden Einzelstränge aufgetrennt wurde. Daran schloss sich das Annealing, d. h. die Hybridisierung der Primer an ihre spezifische komplementäre Sequenz, an. Die dabei verwendete Temperatur orientierte sich an der Schmelztemperatur (melting temperature, T_m) der Primer.

Nach Anlagerung der Primer erfolgte die Synthesephase bei 72°C, in der eine thermostabile DNA-Polymerase, die ursprünglich aus thermophilen Bakterien stammt (Taq-Polymerase aus *Thermus aquaticus*), die Primer am freien 3'-OH-Ende mit Hilfe von dNTPs verlängert und dadurch wieder einen Doppelstrang synthetisiert. Die Prozessivität der Taq-Polymerase liegt bei ungefähr 1000 Basenpaaren (bp) pro Minute bei optimaler Temperatur.

3.3.2.2 Reaktionsbedingungen

Die Reaktionsansätze hatten typischerweise ein Endvolumen von 50 µl und eine Zusammensetzung, die der Tabelle 2 zu entnehmen ist. Anschließend wurde in einem

Thermocycler (Mastercycler Personal der Firma Eppendorf) die PCR-Reaktion durchgeführt, wofür je nach Gen und Exon unterschiedliche Programme entwickelt wurden. Ein PCR-Programm zur Amplifikation der kodierenden Bereiche des *HDAC6*-Gens ist in Tabelle 3 exemplarisch dargestellt.

5 µl	10 x ThermoPol Buffer (New England Biolabs)
5 µl	dNTPs (Endkonzentration 2,5 mmol pro dNTP)
1 µl	Sense primer
1 µl	Antisense primer
1 µl	Genomische DNA
1 µl	Taq-Polymerase
36 µl	Nucleasefreies Wasser

Tabelle 2: Zusammensetzung eines Reaktionsansatzes für eine PCR Optimierungsmöglichkeiten sind dem Abschnitt 3.3.2.4 zu entnehmen.

1.	95°C	1 Min	Denaturierung der DNA
2.	40 Zyklen		
	(1) 94 °C	15 Sek	Aufschmelzen der DNA Doppelstränge
	(2) 59 °C	1 Min	Anlagerung der Primer (Annealing)
	(3) 72 °C	1 Min	Synthese des Doppelstrangs (Extension)
3.	72 °C	7 Min	Finale Extension

Tabelle 3: PCR-Programm am Beispiel des *HDAC6*-Gens

3.3.2.3 PCR-Primer

Um die für die PCR notwendigen Primer zu konzipieren, stehen verschiedene Internetdatenbanken zur Verfügung, wie zum Beispiel die des Helmholtz Zentrum München (<http://ihg.gsf.de/ihg/ExonPrimer.html>, 2014), die für die vorliegenden Primer genutzt wurde. Die Sequenzen der verwendeten Primer finden sich im Anhang.

Die jeweils zusammengehörigen sense und antisense primer wurden nach ähnlicher Schmelztemperatur, GC-reicheren Sequenzen am 3'-Ende, fehlender Komplementarität zueinander und der Fähigkeit, keine störenden Sekundärstrukturen wie hairpin oder stemloop auszubilden, ausgewählt.

Anschließend wurden die Primer über Metabion (<http://www.metabion.com>, 2014) bezogen.

3.3.2.4 Optimierungsmöglichkeiten

Um den Versuchsansatz zu optimieren, stehen verschiedene Reagenzien zur Verfügung, die zusätzlich eingesetzt werden können.

Ein Zusatz von Dimethylsulfoxid (DMSO) beispielsweise unterbindet die Ausbildung von Sekundärstrukturen der Template-DNA und erleichtert damit besonders die Amplifikation von GC-reicher Template-DNA (Hung, Mak et al. 1990).

Auch Mg^{2+} -Ionen können in Form von $Mg^{2+}SO_4$ zum Reaktionsansatz zugegeben werden, da sie einen wichtigen Co-Faktor der Polymerase darstellen, indem sie lösliche Komplexe mit der DNA und den dNTPs, also den Substraten der Polymerase herstellen. Gleichzeitig wirken sie stabilisierend auf die spezifische Anlagerung der Primer an die Template-DNA.

Ferner kann auch die Menge an eingesetzter genomischer DNA erhöht werden, falls man nur schwache Banden im Gel erhält und die Ausbeute an PCR-Produkten nicht ausreichend ist.

Des Weiteren besteht die Möglichkeit, eine sog. Hot Start Taq-Polymerase zu verwenden. Der Unterschied in der Anwendung liegt im ersten Schritt, bei dem die Reaktion erst gestartet wird, wenn eine gewünschte Zieltemperatur, meist in Höhe von $95^{\circ}C$, erreicht und die DNA vollständig aufgeschmolzen ist. Zudem beginnt die DNA-Synthese erst, wenn die Primer spezifisch an die gewünschten Stellen gebunden haben und ihre Konzentration nicht durch Bildung von Primer-Dimeren verringert wurde.

3.3.3 Agarose-Gelelektrophorese und Gelextraktion

Die Gel-Elektrophorese diente der Auftrennung der durch PCR erzeugten DNA-Fragmente aufgrund ihrer unterschiedlichen Größe im elektrisch geladenen Feld. Wegen der durch die Phosphatreste (PO_4^{3-}) vermittelten negativen Nettoladung der DNA bewegt sich diese von der Kathode zur Anode und wird entsprechend ihrer spezifischen Größe aufgetrennt. Mit Hilfe der Banden eines mitlaufenden Standards (Fermentas Gene Ruler 100 bp DNA Ladder, $0,1 \mu g/\mu l$) konnte die Länge der Fragmente abgeschätzt werden.

Für die Herstellung der Gele wurde die Agarose (Invitrogen UltraPure Agarose) im jeweiligen Laufpuffer (TAE-Puffer) suspendiert und anschließend aufgeköcht. Die Konzentration des Agarose-Gels wurde in Abhängigkeit der erwarteten Fragmentgröße des PCR-Produkts gewählt. Die Spannweite der Trennfähigkeit liegt zwischen 10-20 Basenpaaren im 4,0%igen Gel und 12 000 Basenpaaren im 0,8%igen Gel.

Nach Aufkochen und Abkühlung wurde die Lösung mit Ethidiumbromid (EtBr 10 mg/ml, 1 µl pro 25 ml TAE-Puffer) versetzt, in die Gelschlitten gegossen und 30 min ausgehärtet. Danach wurde das Gel in die mit TAE-Puffer gefüllte Wanne eingebracht und die mit Loading-Buffer (6fach Loading Dye) gemischten PCR-Produkte in die entstandenen Taschen hineinpipettiert. Der Ladepuffer sorgte dafür, dass die DNA-Lösung beschwert wird und nach dem Einfüllen in die Geltaschen nach unten sinkt und nicht in den Laufpuffer diffundiert. Die Farbstoffe des Ladepuffers dienten auch der Abschätzung der Migration der PCR-Fragmente während der Elektrophorese.

In der Regel wurde eine Spannung von 120 Volt über 45 bis 60 min angelegt, um eine saubere Trennung der DNA von den jeweiligen Primern zu erreichen. Nach dieser Auftrennung wurden die DNA-Ethidiumbromidkomplexe in der Gelmatrix optisch durch UV-Licht nachgewiesen. Ethidiumbromid interkaliert aufgrund seiner planaren Struktur zwischen den Basen der DNA. Bei Bestrahlung mit UV-Licht fluoresziert der Ethidiumbromid-DNA-Komplex bei 254 nm im sichtbaren Bereich orange-rosa bis lila, so dass die aufgetrennte DNA bei Auflage des gefärbten Gels auf einen UV-Schirm als Bande sichtbar wurde und ausgeschnitten werden konnte.

Die Gelextraktion zur Isolierung der DNA aus den Gelstücken erfolgte mit dem Nucleid Acid and Protein Purification Kit von Macherey-Nagel nach Angaben des Herstellers.

3.3.4 Sequenzanalyse

Die direkte Sequenzierung der aufgereinigten PCR-Produkte zur Bestimmung der Abfolge und Position der Basenpaare in den untersuchten Genen wurde durch die Firma Eurofins MWG Operon, Ebersberg mittels der Didesoxymethode nach Sanger durchgeführt.

Die Sequenzen standen danach als Download auf der Homepage der Firma (<http://www.eurofinsdna.com/>, 2014) zur Verfügung und wurden anschließend mit den dazugehörigen Datenbanksequenzen verglichen, um potentielle Veränderungen in der Basenabfolge festzustellen und somit Genvarianten oder Mutationen zu detektieren. Die

erhaltene Sequenz wurde auf der Homepage des National Center for Biotechnology Information (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, 2014) mit der entsprechenden Wildtypsequenz verglichen. Die Genbank-Zugangsnummern der untersuchten Gene finden sich im Anhang.

3.4 Next-Generation-Sequencing

Die Next-Generation-Sequencing-Analysen wurden am Genzentrum der LMU München, Labor für Funktionelle Genomanalyse in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Dr. Helmut Blum mit nachfolgenden Gerätschaften und Reagenzien durchgeführt.

Um eine Sequenzierbibliothek zu erstellen, wurde die fragmentierte genomische DNA mithilfe des Paired-End DNA Sample Preparation Kit (Illumina) nach Angaben des Herstellers vorbereitet. In einem initialen Reparaturschritt wurden die 3'- und 5'- Enden der DNA-Fragmente mit Klenow-Enzym und T4-Polymerase repariert. Anschließend wurden die 5'-Enden phosphoryliert und die 3'-Enden adenyliert. Die beiden Enden der DNA-Fragmente wurden mit zwei doppelsträngigen Adapterfragmente mit Thymidin-Überhang im Verhältnis 10:1 (Adapteroligonukleotid:DNA-Fragment) ligiert. Die nachfolgende Analyse erfolgte in einem 2%igen Agarosegel, aus dem DNA-Fragmente mit einer Länge von 300 ± 25 Basenpaaren mit dem QIAamp DNA Mini Kit extrahiert und anschließend gereinigt wurden. Eine PCR-Amplifizierung erfolgte nur von denjenigen DNA-Fragmenten, denen zwei unterschiedliche Adapternukleotide angefügt worden waren.

Die so entstandenen adapterligierten DNA-Fragmente wurden im nächsten Schritt an einer optischen Oberfläche (sog. Flow Cell) an komplementäre Adapter-Oligonukleotide (= Capture Oligo) gebunden. Dieses Capture Oligo diente als Starternukleotid für die anschließende Synthese von antiparallelen Strängen der zu sequenzierenden DNA-Moleküle. Im nachfolgenden Denaturierungsschritt verblieb nur ein einzelsträngiges DNA-Fragment auf der Flow Cell, das als Primer für die folgenden Syntheserunden diente. Dieses Prinzip der sog. isothermalen Brückenamplifikation wurde mehrfach wiederholt, sodass millionenfache Cluster entstanden, von denen jedes einzelne aus ein- bis zweitausend klonalen DNA-Fragmenten zusammengesetzt sind. Vor der ersten Sequenzierung wurden alle DNA-Fragmente, die über Adaptermoleküle an der Flow Cell immobilisiert waren, mithilfe einer spezifischen Restriktion entfernt. An den freien Enden des Adapters erfolgte anschließend die Hybridisierung des komplementären

Sequenzierprimers. Anschließend wurde nach dem Syntheseprinzip sequenziert und fluoreszenzmarkierte Nukleotide – pro Zyklus jeweils nur eines – eingebaut. Nach jedem Syntheseschritt wurde die eingebaute Base mittels Fluoreszenz-Mikroskopie detektiert und anschließend der Farbstoff entfernt, sodass das entstehende DNA-Fragment bei dem nächsten Synthesesyklus wieder für einen Farbstoff frei war. Die Analyse der Sequenzierbibliotheken erfolgte mittels der sog. Paired-End Methode, bei der der in der Sequenzierung generierte Strang durch Denaturierung entfernt wird und die auf der Flow Cell verankerten Einzelstränge erneut einer Brückenamplifizierung unterzogen werden.

Die Sequenzabschnitte wurden entsprechend des humanen Referenzgenom (UCSC hg19) angeordnet mit Hilfe von BWA (Burrows-Wheeler Alignment tool), (Li and Durbin 2010). Die erhaltenen Sequenzdateien wurden mit SAMtools (Li and Durbin 2009) für die nachfolgenden Anwendungen formatiert. Varianten von Einzelbasen wurden mit Hilfe von Varscan v2.2 (Koboldt, Chen et al. 2009) identifiziert. Die Liste von Genvarianten wurde gefiltert, um häufige Varianten bzw. Polymorphismen in der dbSNP137 auszuschließen.

3.5 Mikrobiologische Methoden

3.5.1 Klonierung

Bei der Plasmidklonierung wurden sowohl die unterschiedlichen Vektoren pLXSN, pCMV-Myc, pCMV-HA (Clontech), pSNAP (New England Biolabs) als auch die interessierenden DNA-Inserts (GNE wt, GNE M712T, GNEmutNES) mit denselben Restriktionsenzymen geschnitten, sodass kohäsive Enden an Vektor- und Insert-DNA entstanden, die anschließend in der Ligation kovalent miteinander verknüpft wurden. Um sicherzustellen, dass die gewünschte Sequenz tatsächlich inseriert wurde und um Fehler in der Basenabfolge auszuschließen, wurde das entstandene Teilstück direkt sequenziert und analysiert.

3.5.2 Ligation

Die Ligation erfolgte, um die gewünschten DNA-Abschnitte dauerhaft in den Vektor zu integrieren, mittels der T4-DNA-Ligase von Fermentas.

1 µl	Vektor
1,5 µl	Insert
1 µl	Ligase T4
1 µl	10x T4 Ligase Puffer
5 µl	dH ₂ O

Tabelle 4: Pipettierschema eines typischen 1:2-Ligationsansatzes

Die so entstandenen Ansätze wurden entweder über Nacht bei 16°C oder 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Um anschließend die Transformation in *E. coli* vorzubereiten, wurde die T4-Ligase bei 65°C 5 min inaktiviert.

3.5.3 Bakterienkultur

Die verwendeten Bakterien waren chemisch kompetente Bakterien vom Stamm *E. coli* (DH5α-Zellen) der Firma Invitrogen. Sie wurden je nach ihrer weiteren Verwendung entweder in LB-Flüssigmedium oder auf LB-Platten kultiviert. Entsprechend des jeweiligen Resistenz-Gens der Plasmid-DNA wurden in die Ansätze die Antibiotika Ampicillin (100 µg/ml) bzw. Kanamycin (50 µg/ml) zugegeben.

3.5.4 Transformation von Plasmid-DNA in *E. coli*

Für das Einbringen des Ligationsansatzes in die *E. coli* wurde die sog. Hitzeschock-Methode angewendet. Hierbei wurde 1,5 µl des Ligationsansatzes zusammen mit 50 µl Bakterien 30 min auf Eis inkubiert, dann für 30 sec einem Hitzeschock von 42°C im Wasserbad ausgesetzt und abschließend 2 min auf Eis abgekühlt.

3.5.5 Plasmid-DNA Isolierung aus Bakterien

Für die Extraktion der Plasmid-DNA aus den Bakterien wurden je nach Menge des Plasmids verschiedene Kits verwendet (3 ml Kultur: QIAprep Miniprep Kit bzw. 250 ml Kultur: QIAprep Maxiprep Kit, Qiagen), um die rekombinanten Klone anschließend analysieren zu können bzw. für Transfektionsexperimente zu präparieren.

3.6 Zellkultur

3.6.1 Transfektion

Zur weiteren Analyse der Expressionsprodukte der veränderten Gene in eukaryontischen Zellen wurde die Plasmid-DNA in Zellen der Zelllinien HeLa und C2C12 transfiziert. Die Zellen wurden bei 37°C in einer angefeuchteten Atmosphäre mit 5% CO₂ in DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) kultiviert, das zuvor mit 10% fetalen Kälberserum (FBS), Glutamin und den Antibiotika Streptomycin (0,1 mg/ml) und Penicillin (100 U/ml) supplementiert wurde.

Am Tag vor der Transfektion wurden die Zellen so ausgesät, dass ca. 24 Stunden später eine Zelldichte von 10⁵ bis 2x10⁵ mit einer Konfluenz von 50-60% erreicht wurde, was die optimale Ausgangssituation für die nachfolgende Transfektion darstellte. Als Reagenz wurde Polyplus jetPEITM (Polyplus-transfection SA) entsprechend den Angaben des Herstellers verwendet.

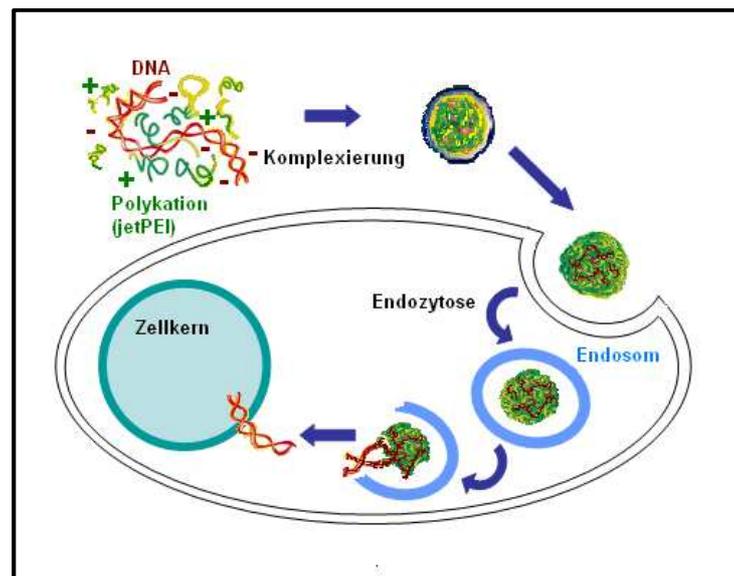


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Transfektion Der Transport der DNA (rot) erfolgt mit Hilfe kationischer Polymere (jetPEI, grün) in den Zellkern. Abbildung modifiziert nach Sieverling 2005 und <http://www.nano-lifescience.com>, 2014.

3.6.2 Färbung und Immunfluoreszenz

Um die Zellen für die Immunfluoreszenz zu färben, wurden sie ca. 48 Stunden nach der Transfektion mit PBS gewaschen und anschließend 15 min mit 3,7% Paraformaldehyd in 1xPBS fixiert. Für die Permeabilisierung wurde 0,1% Triton in 1xPBS ca. 10 min zugegeben und nach dreimaligem Waschen mit 1xPBS zur Hemmung der

unspezifischen Bindungsstelle für eine Stunde die Blockierlösung (0,05% Triton X-100, 5% Pferdeserum in 1xPBS) hinzugefügt.

Über Nacht wurde der erste Antikörper (1:25 verdünnt mit 0,05% Triton X-100 und 5% Pferdeserum in 1xPBS) bei 4°C inkubiert. Danach wurden die Zellen erneut dreimal mit 1xPBS gewaschen, bevor der zweite Antikörper für ca. 1 Stunde auf die Zellen gegeben werden konnte. Die Inkubation mit dem zweiten Antikörper erfolgte bei Raumtemperatur. Für die Färbung der Zellkerne wurde Hoechst 33258 (Sigma, Stammlösung 0,1 mg/ml) 1:1000 in PBS verdünnt und für 5 min inkubiert.

Nach dreimaligem Waschen mit 1xPBS (jeweils 5 min bei Raumtemperatur) wurden die Deckgläschen mit Dako Fluorescent Mounting Medium (Dako) eingedeckt, getrocknet und mit Nagellack versiegelt.

3.7 Proteinchemische Methoden

3.7.1 Probenaufbereitung für Western-Blot und Proteinbestimmung

Für die Herstellung des Lysis-Puffers, der benötigt wird, um die transfizierten Zellen aufzuschließen und anschließend deren Proteinkonzentration bestimmen zu können, wurden 1% SDS mit 10 mM Tris/HCl bei einem pH-Wert von 7,4 zusammenpipettiert.

Die transfizierten Zellen wurden nach Absaugen des Mediums einmal sanft mit kaltem PBS gewaschen (ca. 5 ml) und anschließend in 2 ml PBS mit einem Zellschaber vom Zellboden abgekratzt und in ein Eppendorf-Röhrchen überführt. Die Zellen wurden abzentrifugiert (10 min bei 14 000 rpm und 4°C) und der Überstand an PBS mit der Pipette abgenommen. Die Zellyse erfolgte durch Zugabe von Zell-Lysis-Puffer; je nach Größe des Zellpellets zwischen 100 und 300 µl.

Die anschließende Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mit Hilfe des Bicinchoninsäure (BCA) Assays in zwei Schritten. Zunächst wurden jeweils 10 µl der zu vermessenden Probe mit 200 µl der BCA-Arbeitslösung in eine 96well-Platte pipettiert. Diese Arbeitslösung wurde aus BCA Protein Assay Reagent A und B der Firma Thermo Scientific hergestellt. Als Standard wurden Lösungen mit folgenden Konzentrationen inkubiert (in mg/ml): 2, 1, 0,5, 0,25 und 0,125. Zusätzlich wurde eine Negativkontrolle bzw. ein Leerwert mit 10 µl Wasser angelegt. Nach einer Inkubation von 30 min bei 37°C unter leichtem Schütteln erfolgte die Absorptionsmessung bei 562 nm. Anschließend wurden die erhaltenen Werte mittels des Programms Softmax Pro

ausgewertet und eine Kalibriergerade aus den Absorptionswerten der Standardlösungen erstellt. Dabei befanden sich auf der y-Achse die gemessenen Absorptionswerte bei 562 nm und auf der x-Achse die Menge an Standardprotein. Die Kalibrierung wurde für die Berechnung der Proteinmenge in den eingesetzten Proben herangezogen.

3.7.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Es wurde eine diskontinuierliche Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Laemmli durchgeführt (Laemmli 1970), bei der die Proteine in Gegenwart eines Überschusses an SDS (sodium dodecyl sulfate, Natriumdodecylsulfat) gelelektrophoretisch nach ihrer Größe aufgetrennt werden. Als diskontinuierlich wird sie deswegen bezeichnet, weil sich das Gel in zwei Abschnitte unterteilt: ein Sammelgel (stacking gel) oben und ein Trenngel (separating gel) unten, die sich in ihrem pH-Wert und dem Anteil an Acrylamid unterscheiden.

Erforderliche Lösungen:

Lower Tris (4x): 36,34 g Tris Base
Ca. 5 ml HCl conc., titriert auf pH=8,8
8 ml 10% SDS
H₂O ad 200 ml

Upper Tris (4x): 6,06 g Tris Base
Ca. 4 ml HCl conc., titriert auf pH=6,8
4 ml 10% SDS
H₂O ad 100 ml

Gel-komponenten	Trenngel (Separating gel)	10%	Sammelgel (Stacking gel)
	8%	10%	
H ₂ O	9,66 ml	8,33 ml	3,25 ml
Lower Tris	5,0 ml	5,0 ml	-
Upper Tris	-	-	1,25 ml
Acrylamid	5,34 ml	6,67 ml	0,55 ml
TEMED	20 µl	20 µl	10 µl
APS	100 µl	100 µl	20 µl

Tabelle 5: Pipettierschema der Minigele für die SDS-PAGE

Nach Aushärten bzw. Polymerisation der Gele und Einbringen in den Elektrophoresetank konnten die Proteinproben geladen werden, die zuvor mit Probenpuffer versetzt, zur Denaturierung 5 min aufgekocht und anschließend für 1 Minute bei 11 000 rpm abzentrifugiert wurden. In der Regel wurde in je Tasche zwischen 5 und 20 µl Proteinprobe geladen.

Zur Molekulargewichtsbestimmung wurden Referenzproteine der Firma Fermentas verwendet (PageRuler™ Prestained Protein Ladder). Zu Beginn wurde ca. 30 min eine Spannung von 80 Volt angelegt (10 mA konstant pro Gel), bis die Proben das Trenngel erreicht hatten und der Marker sich vollständig aufgetrennt hatte. Dann wurde die Spannung auf 120 Volt erhöht (20 mA konstant pro Gel), bis die Lauffront der aufgetrennten Proteine das untere Ende des Gels erreicht hatte (ca. 1 Stunde).

3.7.3 Western-Blot

Durch das sog. Wetblot-Verfahren wurden im Anschluss die Proteine auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Der Transfer erfolgte meist über Nacht im Kühlraum (4°C) bei einer konstanten Spannung von 30 Volt in einer mit Blottingpuffer gefüllten Elektrophoresekammer. Der Blot wurde nach dem Proteintransfer zunächst 30 min in TBS-T gewaschen und anschließend über Nacht oder optional 2 Stunden in einer Blockierlösung bestehend aus TBS-T (Tris buffered saline mit 0,1% Tween-20) und 5%igen Milchpulver zur Absättigung unspezifischer Epitope inkubiert. Danach wurde der Blot unter konstantem Schütteln mindestens 1 Stunde bzw. ebenfalls über Nacht bei 4°C

mit dem verdünnten primären Antikörper inkubiert, wobei sich die Verdünnung nach dem jeweiligen verwendeten Antikörper und der Zelllinie richtete (HA-Tag Polyclonal Antibody (#631207), Clontech, 1:500 für HeLa-Zellen, 1:1500 für C2C12-Zellen und c-Myc Monoclonal Antibody (#631206), Clontech, 1:100 für HeLa-Zellen und 1:500 für C2C12-Zellen).

Die Inkubation mit dem sekundären HRP (horse radish peroxidase)-gekoppelten Antikörper über eine Stunde erfolgte erst nachdem der Blot 5-mal jeweils 5 min mit TBS-T gewaschen wurde. Die jeweilige Verdünnung war wiederum antikörperspezifisch. Im Allgemeinen wurde der Sekundärantikörper in der Blockierlösung verdünnt. Nach der Inkubation wurde der Blot erneut 5 mal 5 min mit TBS-T gewaschen.

Zum Nachweis von spezifisch gebundenen Primärantikörpern mit Hilfe der „Enhanced Chemiluminescence“-ECL-Detektion wurde die Membran mit dem entsprechenden Volumen Detektionsreagenz inkubiert und anschließend die Lichtemission detektiert (Geldokumentationssystem, INTAS, Göttingen).

4 ERGEBNISSE

4.1 Analyse des *MYBPC3*-Gens

Zunächst wurde die molekulargenetische Analyse des *MYBPC3*-Gens durchgeführt. Das *MYBPC3*-Gen ist auf Chromosom 11p11.2 lokalisiert (Gautel, Zuffardi et al. 1995), umfasst mehr als 21 kb und besteht aus 35 Exons, von denen 2 erstaunlich klein sind und jeweils nur 3 bp enthalten (Carrier, Bonne et al. 1997). Es kodiert für ein Protein, das 1142 Aminosäuren umfasst mit dem Molekulargewicht von 128 kDa (Weber, Vaughan et al. 1993).

4.1.1 Analyse der Indexfamilie

4.1.1.1 Klinische Daten

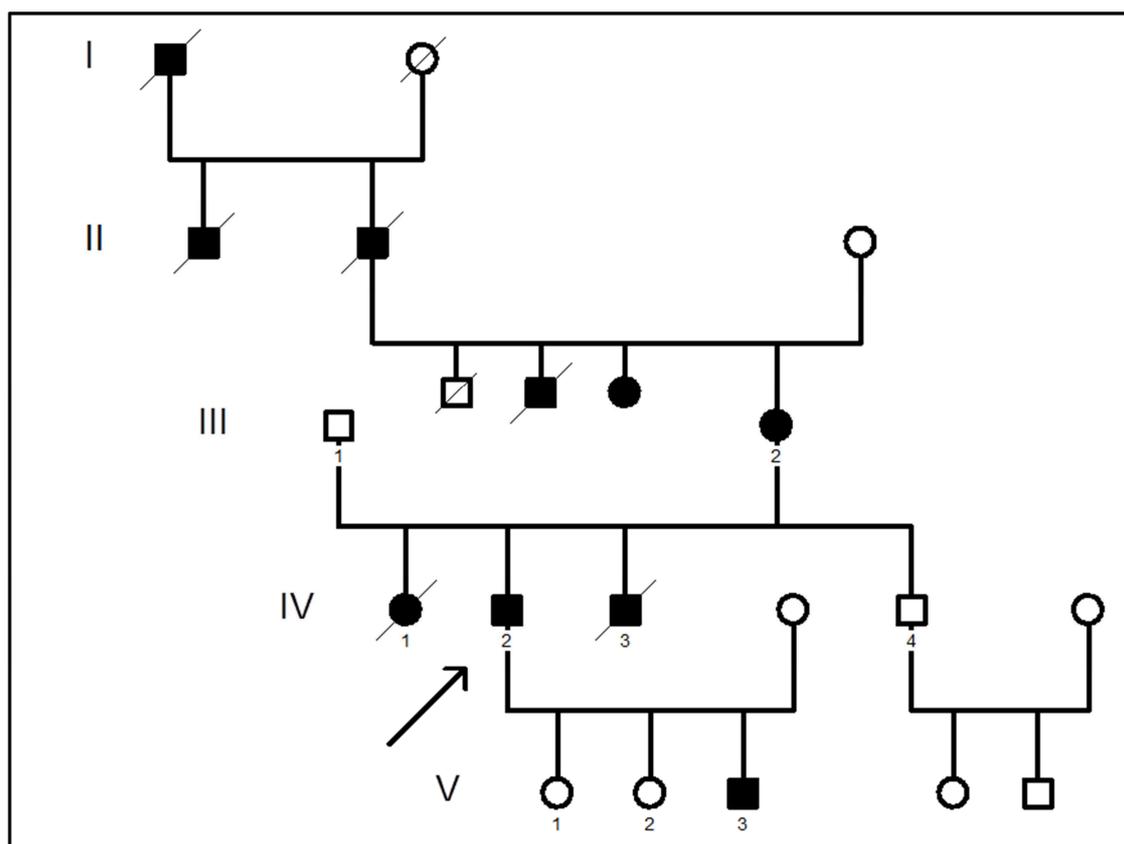


Abbildung 4: Stammbaum der Indexfamilie Der Indexpatient IV, 2 ist mit Pfeil markiert.

Beim Indexpatienten (IV, 2) wurde im Alter von 19 Jahren in einer Routineuntersuchung ein diastolisches Herzgeräusch festgestellt, sodass sich eine weiterführende kardiologische Diagnostik anschloss, die in der Echokardiographie neben einer

Aortenklappeninsuffizienz auch eine Vergrößerung des linken Ventrikels und ein hypertrophes Septum zeigte. Klinisch war der Patient bis auf leichte Leistungseinbußen bei stärkster körperlicher Anstrengung (Fußballspielen) beschwerdefrei. In den jährlich folgenden Kontrolluntersuchungen zeigte sich eine konstante Hypertrophie mit zusätzlicher Stenosekomponente des linksventrikulären Ausflusstraktes, sodass erstmals im Alter von 26 Jahren der Verdacht auf eine hypertrophe, nicht obstruktive Kardiomyopathie gestellt wurde. Zusätzlich fiel mit 531 U/l (Norm < 180 U/l) ein deutlich erhöhter CK-Wert auf. Klinische Zeichen einer Skelettmuskelbeteiligung im Sinne einer Gliedergürtelschwäche waren zu keiner Zeit feststellbar.

Wegen der bekannten hohen Rate an plötzlichen Herztoden bei Patienten mit einer HCM/HOCM (Maron, Gardin et al. 1995) und der im Langzeit-EKG sichtbaren ventrikulären Tachykardien bzw. Salven wurde der Patient im Alter von 34 Jahren primärprophylaktisch mit einem implantierbaren Defibrillator versorgt. Die körperliche Belastbarkeit des Patienten war weiterhin im NYHA-Stadium I stabil und es zeigten sich keine klinischen Symptome einer Herzinsuffizienz, wie Nykturie, Orthopnoe oder periphere Ödeme.

Die 3 Jahre ältere Schwester des Indexpatienten (IV, 1) zeigte erste Anzeichen einer Muskelschwäche bereits in der frühen Kindheit um das vierte Lebensjahr, die sich vor allem an den proximalen Extremitäten manifestierten und eine schwere Gangstörung zur Folge hatten, die schließlich im Alter von 20 Jahren in eine Rollstuhlpflichtigkeit mündete. Zudem entwickelte die junge Patientin beidseits eine Scapula alata, sodass vor über 20 Jahren die klinische Diagnose einer Gliedergürteldystrophie ohne die Möglichkeit eines entsprechenden genetischen Nachweises gestellt wurde. Eine aus dem M. tibialis anterior entnommene Muskelbiopsie zeigte starke myopathische Veränderungen, die mit einer progressiven Muskeldystrophie vereinbar waren. Im Alter von 29 Jahren dekompenzierte die Patientin am ehesten respiratorisch an einer Pneumonie, sodass sie kurze Zeit darauf verstarb.

Der gemeinsame Bruder der beiden oben beschriebenen Patienten (IV, 3) war bereits sehr früh von der familiären Erkrankung betroffen, die in seinem Falle zudem mit sehr rascher Progredienz verlief. So war es ihm fast nicht möglich, eigenständig Laufen zu lernen und war damit sehr früh an den Rollstuhl gebunden. Neben der deutlichen Skelettmuskelaaffektion war bei ihm keine Herzmuskelbeteiligung aufgefallen. Eine im Alter von 8 Jahren durchgeführte Muskelbiopsie zeigte das Bild einer degenerativen

Myopathie mit beginnendem bindegewebigen Umbau. Wegen der immer schwerer verlaufenden Muskeldystrophie und des damit verbundenen Leidensdrucks, suizidierte sich der Patient im Alter von 18 Jahren.

Der zweite Bruder des Indexpatienten (IV, 4) wurde weder klinisch noch molekulargenetisch untersucht.

Die Mutter des Indexpatienten (III, 2) erlitt im Alter von 67 Jahren bei einem medizinischen Routineeingriff einen plötzlichen Herztod, konnte aber erfolgreich reanimiert und anschließend mittels ICD versorgt werden. Dies war die Erstmanifestation einer Herzrhythmusstörung auf dem Boden der familiär vorbekannten Kardiomyopathie. Bis auf eine diskrete, symmetrische Kraftminderung in der Oberarmelevation gestaltete sich der Skelettmuskelbefund in der manuellen Kraftprüfung altersentsprechend normal. Allerdings präsentierte sich die Patientin mit einem Watschelgang und einem angedeuteten Trendelenburgzeichen, als Hinweis auf eine muskuläre Gliedergürtelaffektion.

Der Vater (III, 1) war zu keiner Zeit von einer Herz- oder Skelettmuskelerkrankung betroffen.

Da der Indexpatient (IV, 2) Vater von drei Kindern ist und ein genetischer Hintergrund seiner Erkrankung vermutet wurde, wurden seine Kinder einer kardiologischen und im weiteren Verlauf auch einer neurologischen Untersuchung unterzogen. Dabei präsentierten sich die beiden ältesten Töchter (V, 1 und V, 2) phänotypisch gesund, wohingegen bei dem jüngsten Sohn (V, 3) in der Herzechokardiographie ebenfalls die Diagnose einer hypertrophen Kardiomyopathie gestellt wurde. In der neurologischen Untersuchung zeigte sich bei ihm eine angedeutete Scapula alata beidseits sowie einer leichte Schwäche der Kopfbeuger mit einem Kraftgrad von 4/5 auf der MRC-Skala.

4.1.1.2 Genetik des Indexpatienten IV, 2 und der Schwester IV, 1

Die genetische DNA-Analyse der Gene *MHY7* (schwere Kette des kardialen β -Myosins), *TNNT2* (kardiales Troponin T) und *MYBPC3* inklusive der Spleißstellen und der angrenzenden intronischen Sequenzen, lieferte eine Spleiß- bzw. Missensemutation c.772G>A (p.Glu258Lys) des Exon 6 im *MYBPC3*-Gens in heterozygoter Form bei dem zu diesem Zeitpunkt 43jährigen Indexpatienten.

Bei seiner Schwester isolierten wir *post mortem* aus dem asservierten Muskelbiopsat genomische DNA, die molekulargenetisch analysiert wurde. Dabei zeigte sich dieselbe Mutation.

Auch bei der derzeit klinisch stabilen Mutter (III, 2) wurde die familiäre *MYBPC3*-Sequenzvariante nachgewiesen. Um eine zweite Mutation in einem anderen Gen auszuschließen, die für die kardiale Erkrankung der Mutter ursächlich sein könnte, wurden ebenfalls die Gene *TNNT2* und *MYH7* konventionell molekulargenetisch untersucht, die aber einen Normalbefund lieferten.

Die DNA des Vaters (III, 1) war bezüglich der Gene *MYBPC3*, *TNNT2* und *MYH7* unauffällig.

Die vorliegende Mutation, die erstmals 1998 beschrieben wurde (Niimura, Bachinski et al. 1998) betrifft die letzte Nukleinsäure im Exon 6 und führt zu einer Substitution des sauren Glutamats durch das basische Lysin. Somit handelt es sich um eine Missense-Mutation. Außerdem ergibt sich eine deutlich schlechtere Übereinstimmung der Spleißstelle mit der Spleiß-Konsensussequenz, sodass sich die Spleißeffizienz verringert und die funktionellen Transkripte reduziert werden (Andersen, Havndrup et al. 2004).

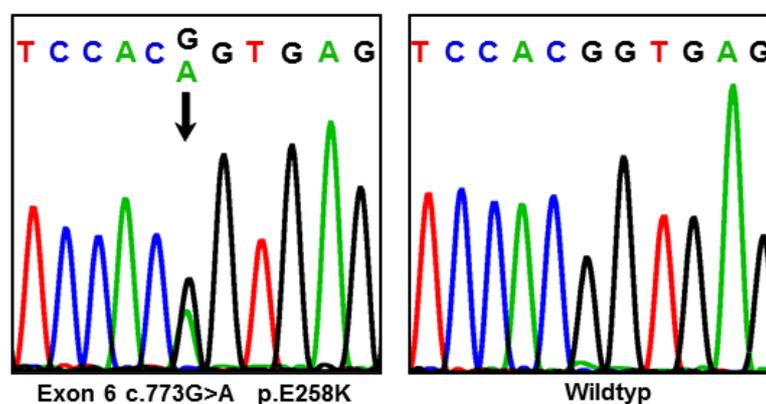


Abbildung 5: Ausschnitt aus dem Elektropherogramm der Sequenzanalyse von Exon 6 des *MYBPC3*-Gens Links ist die Analyse der Patienten-DNA (Schwester des Indexpatienten) mit dem Basenaustausch c.773G>A dargestellt, der zu der Mutation p.E258K führt, rechts der gleiche DNA-Abschnitt einer Normalkontrolle.

4.1.1.3 Bioinformatische Auswertung des Next-Generation-Sequencing

Um zu evaluieren, ob die Schwester des Indexpatienten neben der Mutation im *MYBPC3*-Gen noch weitere Genveränderungen aufwies, die ursächlich für den Gliedergürtelphänotyp sein konnten, wurde die DNA des Indexpatienten, seiner Schwester und der gemeinsamen Eltern einer Next-Generation-Sequencing (NGS)-Analyse (Whole Exome Sequencing) unterzogen. Die anschließende bioinformatische Auswertung der gewonnenen Daten erfolgte über die Galaxy-Plattform (<http://10.163.242.7/galaxy>, 2014) und die Anwendung VarScan, die der Variantendetektion im Genom dient (Koboldt, Chen et al. 2009).

Der erste Analyse-Algorithmus ist schematisch in Tabelle 6 dargestellt. Zunächst wurde bei allen vier Patienten eine SNP-Varianten-Detektion durchgeführt. Dabei erhielt man zwischen 85623 SNPs beim Vater und 91743 SNPs bei der betroffenen Tochter. Die anschließende Auswertung über „VarScanCompare“ verglich die zwei Datensätze der Eltern auf SNPs, die bei beiden Eltern gleich, aber heterozygot waren, sodass sich die Anzahl der gefundenen SNPs auf 49579 verringerte. Um alle homozygoten Varianten der Kinder zu detektieren, wurde der sog. „VarScanFilter“ angewendet, der bei der Tochter das Ergebnis von 35897 SNPs in homozygoter Ausprägung lieferte. Hiervon wurden die homozygoten Varianten des Indexpatienten d. h. des Sohnes bzw. Bruders subtrahiert. Nun wurden diese gefundenen Auffälligkeiten mit den bisher bekannten häufigeren SNPs (Allelfrequenz >1%) und dem Referenzgenom (<http://genome.ucsc.edu/>, 2014) abgeglichen, um nur kodierende Sequenzen zu betrachten. Letztlich fanden sich 505 Sequenzvarianten bei der Tochter, die möglicherweise pathogen sind und homozygot vererbt sein konnten.

		<i>lines</i>
VarScanSNP	Vater	85.623
	Mutter	90.803
	Sohn	91.505
	Tochter	91.743
VarScanCompare	Vater + Mutter	49.549
VarScanFilter	Tochter	35.897
	Sohn	36.443
VarScanCompare	Tochter (homozygot) + (Vater + Mutter)	26.813
	Tochter (homozygot) + (Vater + Mutter) - Sohn (homozygot)	6.527
VarScanLimit	SNP-Filter bei Tochter	2.067
	Genom-Filter bei Tochter	505

Tabelle 6: Analyse-Algorithmus der Daten des Next-Generation Sequencing der Indexfamilie zur Identifikation homozygoter SNPs in Kandidatengenomen für eine rezessive hereditäre Skelettmuskelerkrankung.

Um diese 505 Auffälligkeiten im Genom der Tochter weiter einzugrenzen und möglichst einen Hinweis zu erhalten, ob neben der p.E258K-Mutation im *MYBPC3*-Gen noch weitere Genvarianten vorliegen, die die Gliedergürtelschwäche verursacht haben könnten, wurden weitere Kandidatengene genauer auf Änderungen der Gensequenz untersucht. Dabei wurden vor allem die bereits bekannten Gene, die bei Gliedergürteldystrophien verändert sind, genauer analysiert als auch Gene, in denen Mutationen zu Kardiomyopathien führen können. Eine genaue Auflistung der mittels Galaxy-Plattform und IGV Genome Browser (Robinson, Thorvaldsdottir et al. 2011) nachgeprüften Gene findet sich in Tabelle 7 für die dominanten und rezessiven Gliedergürteldystrophien und in Tabelle 8 für die kardialen Gene.

Überprüft wurden zunächst diejenigen Gene, die auf der Neuromuscular Homepage [Prof. A. Pestronk, Washington University St. Louis (Missouri, USA)] gelistet sind (<http://neuromuscular.wustl.edu/musdist/lg.html#>, 2014 und <http://neuromuscular.wustl.edu/msys/cardiac2.htm#>, 2014).

Kandidatengene	Bemerkungen
LGMD - Dominant	
LGMD1A: Myotilin; 5q31	Dysarthrie
1B: Lamin A/C; 1q21	Kardiale Beteiligung
1C: Caveolin-3; 3p25	Kardiale Beteiligung, Beginn im Kindesalter
1D: DNAJB6; 7q36	
1E: Desmin; 2q35	Kardiale Beteiligung
1F: TNPO3; 7q32	c.2771del (als einzige Mutation beschrieben)
LGMD - Rezessiv	
LGMD2A: Calpain-3; 15q15	
2B: Dysferlin; 2p13.1	
2C: γ -Sarcoglycan; 13q12	Kardiale Beteiligung, Beginn im Kindesalter
2D: α -Sarcoglycan; 17q21	Beginn im Kindesalter
2E: β -Sarcoglycan; 4q12	Kardiale Beteiligung, Beginn im Kindesalter
2F: δ -Sarcoglycan; 5q33	Kardiale Beteiligung, Beginn im Kindesalter
2G: Telethonin; 17q12	Kardiale Beteiligung, Beginn im Kindesalter
2H: TRIM32; 9q33	
2I (MDDGC5): FKRP; 19q13.3	Kardiale Beteiligung
2J: Titin; 2q24	
2K (MDDGC1): POMT1; 9q34	unwahrscheinlich, mit mentaler Retardierung assoziiert
2L: ANO5; 11p14	
2M (MDDGC4): Fukutin; 9q31	Beginn im Kindesalter
2N (MDDGC2): POMT2; 14q24	Beginn im Kindesalter
2O (MDDGC3): POMGnT1; 1p32	
2P (MDDGC7): DAG1; 3p21	Beginn im Kindesalter
2Q: Plectin 1f; 8q24	Beginn im Kindesalter
Myofibrilläre Myopathie	
MFM1 (LGMD 1E): Desmin; 2q35	s. a. LGMD1E, autosomal dominant oder rezessiv
MFM2: CRYAB; 11q22	
MFM3 (LGMD 1A): Myotilin; 5q31	s. a. LGMD1A
MFM4: ZASP; 10q23	
MFM5: Filamin C; 7q32	
MFM6: BAG3; 10q25	
Kongenital: SEPN1; 1p36	
Myosinspeichermyopathie: MYH7; 14q11	
Scapuloperoneale Myopathie: FHL-1; Xq26	
Myopathie + Kardiomyopathie: DPM3; 1q12	
Fazioscapulohumerale (FSH) Dystrophie 1A (FSHMD 1A): 4q35.2, 10qter	

Tabelle 7: Auf Polymorphismen überprüfte Kandidatengene bei der Schwester des Indexpatienten. Mutationen in oben aufgeführten Genen verursachen eine Muskelschwäche vom Gliedergürtel-, scapulohumeralen oder fazioscapulohumeralen Typ.

Kandidatengene	Bemerkungen
Hypertrophe Kardiomyopathien (HCM)	
HCM 1: Cardiac β -myosin heavy chain (MYH7); 14q11.2	autosomal-dominant
2: Cardiac troponin T2 (TNNT2); 1q32.1	autosomal-dominant
3: α -Tropomyosin (TPM1); 15q22.3	autosomal-dominant
4: Cardiac myosin binding protein-C (MYBPC3); 11p11.2	autosomal-dominant
5: analog zu HCM 4	
6: PRKAG2; 7q36.1	Beginn im Kindesalter; autosomal-dominant
7: Troponin I, Cardiac (TNNI3); 19p13.42	autosomal-dominant; Mutationen verursachen auch restriktive und dilatative Kardiomyopathien
8: Myosin light chain (MYL3); 3p21.31	autosomal-dominant und -rezessiv
9: Titin (TTN); 2q31.2	familiär/sporadisch; Mutationen sind evtl. Polymorphismen
10: Myosin light chain (MYL2); 12q24.11	autosomal-rezessiv
11: α actin (ACTC1); 15q14	autosomal-dominant; auch dilatative Kardiomyopathien (DCM)
12: Cysteine- and glycine-rich protein 3 (CSRP3); 11p15.1	autosomal-dominant; nur vier bekannte Mutationen
13: Troponin C, Slow (TNNC1); 3p21.1	autosomal-dominant
14: α -Myosin, heavy chain 6 (MYH6); 14q11.2	autosomal-dominant
15: Vinculin (VCL); 10q22.2	L277M (als einzige Mutation beschrieben)
16: Myozenin 2 (MYOZ2; Calsarcin 1); 4q26	S48P; I246M (als einzige Mutationen beschrieben)
17: Junctophilin-2 (JPH2); 20q13.12	S101R; Y141H; S165F; G505S (als einzige Mutationen beschrieben)
18: Phospholamban (PLN); 6q22.31	autosomal-dominant
19: Calreticulin 3 (CALR3); 19p13.11	K92R (als einzige Mutation bei männlichen Australiern beschrieben)
20: Nexilin (NEXN); 1p31.1	Q131E; R279C (als einzige Mutationen bei einer chinesischen Familie)
21: 7p12.1-q21	autosomal-dominant; nur eine Familie beschrieben
22: Myoplladin (MYPN); 10q21.3	Y20C (als einzige Mutation beschrieben)
23: Myosin light chain kinase 2 (MYLK2); 20q11.21	
HCM durch Mutationen in Proteinen der Z-Scheibe	
Telethonin (TCAP); 17q12	autosomal-dominant; R87Q (als einzige Mutation), s. a. LGMD 2G
ZASP (Lim domain-binding 3 (LDB3)); 10q23.2	autosomal-dominant; s. a. MFM 4
α -Actinin-2 (ACTN2); 1q43	A119T; T495M; E583A; E628G (als einzige Mutationen beschrieben)
Ankyrin repeat domain protein 1 (ANKRD1); 10q23.31	autosomal-dominant; 11 bekannte Mutationen, v.a. DCM
weitere Gene, die möglicherweise HCM/LGMD verursachen	
Myosin-binding protein c, slow type (MYBPC1); 12q23.2	muskel-spezifische Skelettmuskelexpression
Myosin light chain (MYL6); 12q13.2	Expression in glatten Muskelzellen
Dystrophin (DMD); Xp21.2-p21.1	Duchenne- u. Becker-Dystrophie, dilatative Kardiomyopathie
Dystrobrevin alpha (DTNA); 18q12.1	Non-Compaction Kardiomyopathie, auch kongenital
Actin alpha 1 (Acta1); 1q42.13	Nemaline-Myopathie
PR domain-containing protein 16; (PRDM16); 1p36.32	familiäre dilatative Kardiomyopathie mit Beginn im Kindesalter

Tabelle 8: Übersicht über die untersuchten Gene, die an der Entstehung einer hypertrophen Kardiomyopathie (HCM) beteiligt sein können.

In Tabelle 9 sind die einzelnen Varianten aufgelistet, die bei der Schwester des Indexpatienten in den Kandidatengenomen der Tabelle 7 und 8 gefunden wurden. Die Variantenfrequenz gibt hierbei Aufschluss darüber, ob die Veränderung homo- oder heterozygot vorliegt. Werte nahe 50% stehen für eine heterozygote Ausprägung; Werte nahe 100% für eine homozygote. Die gefundenen Auffälligkeiten sind alle bekannte SNPs, die von der Datenbank des National Center For Biotechnology Information (NCBI, http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_summary.cgi, 2014) mit einer speziellen Identifikationsnummer für SNP, sog. Reference SNP number (rs), gelistet wurden. Die Veränderungen, die in der Nähe einer Spleißstelle liegen oder die Aminosäuresequenz möglicherweise verändern, wurden mittels des Vorhersage-Algorithmus MutationTaster (Schwarz, Rodelsperger et al. 2010) auf ihre Pathogenität überprüft. Dabei zeigte sich, dass es sich aller Wahrscheinlichkeit nach eher um Polymorphismen als um krankheitsverursachende Veränderungen handelt.

Kandidatengen		SNP-ID	Variantenfrequenz	Bemerkungen
CAV3	Caveolin-3	rs1974763	51,52%	
		rs13087941	100%	
DES	Desmin	rs1058261	52,94%	
		rs12920	48,57%	
		rs1058284	57,14%	
TTN	Titin	rs72646809	44,18%	
		rs17354992	41,58%	nicht-synonymer SNP: Polymorphismus
ANO5	Anoctamin 5	rs61910685	45,61%	Polymorphismus
PLEC	Plectin 1	rs78461695	80%	
FLNC	Filamin C	rs2249128	100%	
BAG3	BCL2-Associated Athanogene 3	rs112929734	48,57%	Spleißstellenveränderung möglich
		rs196295	100%	
SEPN1	Selenoprotein 1	rs7349185	100%	
		rs760597	100%	
		rs2294228	100%	
FHL1	Four-and-a-half lim domains 1	rs2076705	100%	
MYH7	Myosin heavy chain 7	rs3729830	57,14%	
		rs7157716	62,50%	
		rs2231124	59,26%	
		rs2069542	50%	Spleißstellenveränderung möglich
		rs2069540	100%	
ANKRD1	Ankyrin repeat domain- containing protein 1	rs6822576	100%	Synonymer SNP
PRDM16	PR domain- containing protein 16	rs870124	45,09%	Nicht-synonymer SNP: Polymorphismus

Tabelle 9: SNPs in den Kandidatengen Tabelle 7 und 8 Diejenigen Veränderungen, die in der Nähe eine Spleißstelle liegen oder möglicherweise zu einer Aminosäureveränderung führen, wurden mittels des MutationTasters auf ihre Pathogenität überprüft. Dabei zeigte sich, dass es sich jeweils mit großer Wahrscheinlichkeit um Polymorphismen handelt.

Im Folgenden wurden nicht nur die oben aufgelisteten Kandidatengene genauer analysiert, sondern alle auffälligen Varianten in ausgewählten Genen, die auch im Muskel exprimiert sind und bei denen sich bei der schwer betroffenen Schwester des Indexpatienten *de novo*-Varianten fanden. Dabei wurde insbesondere nach nicht-synonymen SNPs gesucht, die durch die veränderte Basenabfolge zu einer Aminosäuresubstitution führen. Insgesamt wurden bei der Schwester des Indexpatienten 25 heterozygot vorliegende *de novo* „*missense*“-Substitutionen gefunden. Zudem fand sich eine „*nonsense*“-Mutation, die für ein prämaures Stopp-Codon codiert. Eine Übersicht der gefundenen Sequenzänderungen liefert die Tabelle 10. Die heterozygote Variante im *MYBPC3*-Gen ist ein bekannter Polymorphismus (rs3729986). Ansonsten war keine dieser Auffälligkeiten bislang als krankheitsverursachend beschrieben worden oder als bekannter SNP in der NCBI-Datenbank gelistet worden.

Gen	Exon	Basen- abfolge	Aminosäure- Substitution
TTN	2	Ttg/Gtg	L/V
TRIM11	1	Tct/Gct	S/A
ARID4B	1	aTg/aCg	M/T
ANKRD2	10	Gca/Aca	A/T
MMP21	10	gTg/gCg	V/A
AMPD3	11	Cgg/Tgg	R/W
MYBPC3	11	Gtg/Atg	V/M
CHRD2	11	cGc/cAc	R/H
CEP57	11	caG/caC	Q/H
SERPINA1	14	gTg/gCg	V/A
LAMA5	20	Gtg/Atg	V/M
IRX2	5	gaG/gaT	E/D
ERBB2IP	5	Cgt/Tgt	R/C
ERBB2IP	5	tCg/tTg	S/L
KIAA0415	7	Cgg/Tgg	R/W
RADIL	7	cTc/cCc	L/P
PSPH	7	gCg/gTg	A/V
GGH	8	Tgc/Cgc	C/R
TRPA1	8	Cgc/Tgc	R/C
GSDMD	8	cGt/cAt	R/H
AQP7	9	gaG/gaC	E/D
PRUNE2	9	caG/caT	Q/H
LAMC3	9	cCc/cTc	P/L
TMEM141	9	gAc/gCc	D/A
KCNE1L	X	Cct/Tct	P/S
COL18A1	21	Cga/Tga	R/*

Tabelle 10: Übersicht der im Muskel exprimierten Gene mit heterozygoten Sequenzvarianten bei der Schwester des Indexpatienten Der Stern (*) steht für ein Stopp-Codon, das im Falle des *COL18A1*-Gens anstelle einer Aminosäure übersetzt wird, sodass es zu einem Abbruch der nachfolgenden Transkription kommt (sog. „nonsense“-Mutation).

Zur weiteren, eingehenderen Analyse standen von bioinformatischer Seite keine Algorithmen zur Verfügung, die zuverlässig alle zusammengesetzt heterozygoten Varianten herausfiltern konnten. Dieser Ansatz ist besonders weiterführend unter der

Hypothese, dass die schwer betroffene, verstorbene Schwester des Indexpatienten möglicherweise an einer zusätzlichen rezessiven Erkrankung litt, bei der jeweils ein pathogenes Allel von der Mutter und eines vom Vater stammte. Deshalb wurden bei einer weiteren Auswertungsstrategie alle heterozygoten Varianten in bisher bekannten Genen der GeneTable of Neuromuscular Disorders (<http://www.musclegenetable.fr/>, 2014) untersucht, die mit neuromuskulären Syndromen assoziiert sind. Ausgenommen wurden Gene, die im Zusammenhang mit kongenitalen myasthenen Syndromen, Motoneuronerkrankungen, hereditären Ataxien, Paraplegien und motorischen sowie sensorischen Neuropathien beschrieben wurden.

Nicht-kodierende Bereiche und synonyme SNPs wurden nicht berücksichtigt. Varianten, die bei den anderen Familienmitgliedern homozygot oder heterozygot auftraten und mit Hilfe der Vorhersage-Algorithmen als nicht pathogen eingestuft wurden, wurden ebenfalls ausgeschlossen.

Tatsächlich fanden sich bei der Schwester des Indexpatienten zwei Varianten im Titin-Gen (*TTN*), wobei ein Allel von der Mutter und eines vom Vater stammten. Der Indexpatient, der nur unter der MYBPC3-assoziierten Kardiomyopathie leidet und keine Gliedergürtelbeteiligung zeigt, trägt keines der beiden Allele, so dass insgesamt die identifizierten *TTN*-Varianten mit einem autosomal-rezessiven Erbgang vereinbar sind. Beide Varianten sind Missense-Mutationen, betreffen phylogenetisch hochkonservierte Aminosäurereste im Titinprotein und sind zwar heterozygot bei somatischen Mutationen im Rahmen von Krebserkrankungen (Greenman, Stephens et al. 2007) als Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) vorbeschrieben (rs12463674, Allelfrequenz 0,152 und rs72646809, Allelfrequenz 0,008), jedoch nicht im Zusammenhang mit erblichen Skelettmuskelerkrankungen identifiziert worden.

Die I26225T (I24584T)-Mutation (rs12463674) liegt in der Ig-like 99 IG-like 122 Domäne. Die I17731T (I16090T)-Mutation (rs72646809) befindet sich in der Ig-like 99 Domäne. Ein krankheitsverursachender Effekt ist laut Vorhersage-Algorithmen bei beiden Varianten möglich.

4.1.2 Auswahl und molekulargenetische Analyse weiterer Patientenkollektive

Im Hinblick auf die unter 4.1.1. beschriebene Familie konnte nicht ausgeschlossen werden, dass Veränderungen im *MYBPC3*-Gen mit einer Gliedergürtelmuskeldystrophie assoziiert sein könnten. Um diese Hypothese zu überprüfen, ob und wenn ja, mit

welcher Frequenz und mit welchem Phänotyp, sich Mutationen im kardialen Myosin-bindenden Protein (MYBPC3) bei neuromuskulären Patienten manifestieren, rekrutierten wir ein repräsentatives Patientenkollektiv mit dem übergeordneten Krankheitsbild einer Gliedergürteldystrophie, das einer molekulargenetischen Analyse des *MYBPC3*-Gens unterzogen wurde.

Die 59 Patienten waren zum Zeitpunkt der Untersuchung im Alter zwischen 7 und 88 Jahren (Mittelwert $42,2 \pm 18,8$ Jahre), wodurch ein breites Altersspektrum abgedeckt wurde, da auch der Symptombeginn einer HOcm/HCM mit einer erheblichen Variabilität auftreten kann (Michels, Hoedemaekers et al. 2007). Da bei der Indexfamilie durch das homogene Auftreten der Erkrankung in allen Generationen und der Beteiligung beider Geschlechter von einem autosomal-dominanten Erbgang ausgegangen werden muss, wurden vorrangig Patienten mit positiver Familienanamnese eingeschlossen.

Die genaue klinische Präsentation der Patienten kann der Tabelle 11 entnommen werden.

Variable (n=59)	Ergebnis
Geschlecht, männlich	30
Alter bei Symptombeginn in Jahren, n=52	27,5±18,6
Positive Familienanamnese	24
Klinischer Phänotyp	
klinisch unauffällig	4
HyperCKämie	9
kongenitale Muskeldystrophie	7
belastungsabhängige, prox. betonte Schwäche ohne Paresen, z.T. mit Muskelhypotonie und Myalgien	12
FSHD-Phänotyp	4
LGMD-Phänotyp	12
proximal betonte Beinschwäche mit Paresen	6
Myositis (nicht näher bezeichnet)	5
Serum-Kreatinkinase	
normal	15
< 3facher Normwert	19
> 3facher Normwert	25
Grad der Gehbehinderung	
keine Hilfsmittel	28
Gehstützen oder Rollator	21
Rollstuhl	10
Muskelbiopsie, n=39	
keine Veränderungen nachweisbar	12
Degenerative Myopathie	10
Dystrophische Myopathie	4
Vakuoläre Myopathie	4
Unspezifisch myopathisches Muster	6

Tabelle 11: Klinische Charakteristika der 59 neuromuskulären Patienten mit dem Phänotyp einer Gliedergürteldystrophie ohne molekulargenetischen Nachweis einer pathogenen Veränderung in bekannten ursächlichen Genen für Gliedergürteldystrophien Bei 39 der untersuchten Patienten war im Vorfeld zur Diagnoseklärung eine Muskelbiopsie erfolgt. Sieben Patienten zeigten bislang noch keine Symptome, wurden aber aufgrund ihrer positiven Familienanamnese in die Untersuchung miteingeschlossen.

Bei der molekulargenetischen Analyse des neuromuskulären Patientenkollektivs konnte mit unserer Methodik (direkte Sequenzierung aller kodierender Exons einschließlich angrenzender intronischer Bereiche) keine pathogene Sequenzvariante im *MYBPC3*-Gen detektiert werden, die ursächlich an der Muskelerkrankung beteiligt sein könnte. Einzig ein bekannter Polymorphismus im Exon 6 (p.Ser236Gly bzw. c.761A>G) wurde bei einem Teil der Patienten identifiziert.

Durch direkte Sequenzanalyse konnte bei 11 (18,6%) von insgesamt 59 sequenzierten Personen die Variante c.761A>G (p.S236G) im Exon 6 identifiziert werden, die einen

Austausch der Base Adenosin zu Guanin in der Nukleotidposition 761 zur Folge hat (Abb. 6). Somit wird die neutrale Aminosäure Serin gegen Glycin ausgetauscht, die ebenfalls neutral ist und eine polare Seitenkette trägt.

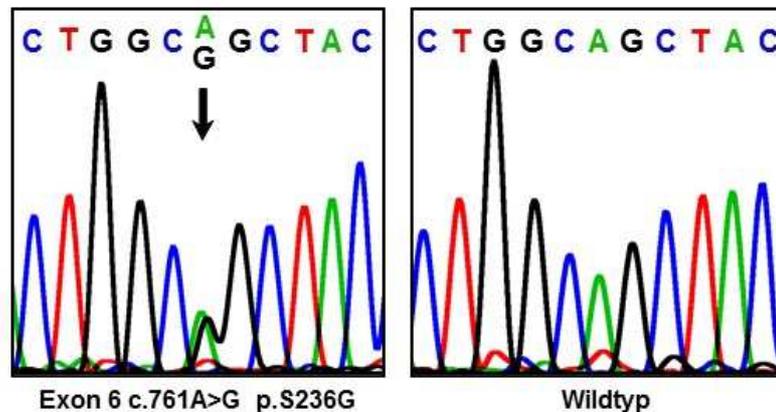


Abbildung 6: Ausschnitt aus dem Elektropherogramm der Sequenzanalyse von Exon 6 des *MYBPC3*-Gens. Der bekannte Polymorphismus im Exon 6 c.761A>G, der zum Aminosäureaustausch von Serin zu Glycin führt, befindet sich auf der linken Seite, die unveränderte Wildtyp-Sequenz ist rechts dargestellt.

Jääskeläinen et al. haben 2002 erstmals diese Variante bei 22 von 111 Kontrollen identifiziert (entspricht 19,8%), konnten aber keine Korrelation mit dem HCM-Phänotyp herstellen, sodass es sich aller Wahrscheinlichkeit nach um einen neutralen Polymorphismus handelt (Jaaskeläinen, Kuusisto et al. 2002).

Auch Daehmlow et al., van Driest et al. und Morita et al. ordneten diese Sequenzvariante eher in die Kategorie der nicht pathogenen Polymorphismen ein (Daehmlow, Erdmann et al. 2002; Van Driest, Vasile et al. 2004; Morita, Rehm et al. 2008).

Allerdings scheint die Pathogenität der Mutation von der Ethnizität der Patienten abhängig zu sein, denn auf der anderen Seite existieren zwei Studien, die die Variante p.S236G als pathogen einstufen. Hayashi et al. berichteten von einer koreanischen und einer japanischen Familie, die beide den klinischen Phänotyp einer hypertrophen Kardiomyopathie ohne Obstruktion aufwiesen und die Sequenzvariante trugen (Hayashi, Arimura et al. 2004). In einem Kollektiv von chinesischen Patienten wurde die Variante sogar als Hot-spot Mutation beschrieben und sowohl mit dem klinischen Phänotyp einer HOCM als auch einer HCM in Verbindung gebracht (Wang, Song et al. 2009).

Gleichzeitig wurde ein zweites Patientenkollektiv rekrutiert, von dem ebenfalls vermutet wurde, dass es eine Kombination aus Herz- und Skelettmuskelschwäche zeigen könnte. Dafür wurden sechs primär kardiologisch auffällige Patienten einschließlich unseres Indexpatienten und dessen Kinder ausgewählt, die alle wegen einer hypertrophen Kardiomyopathie mit oder ohne obstruktive Komponente und einer nachgewiesenen Mutation im *MYBPC3*-Gen in kardiologischer Behandlung waren. Eine Übersicht über die nachgewiesenen Mutationen und deren Position im Gen ist in Abbildung 7 dargestellt.

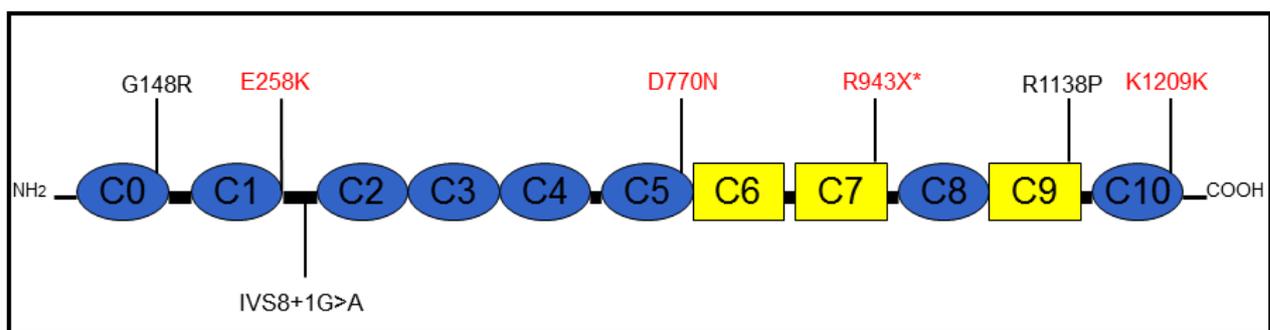


Abbildung 7: Darstellung des *MYBPC3*-Proteins mit den beschriebenen Mutationen Die Immunglobulin-Domänen sind blau; die Fibronectin-Domänen gelb dargestellt. Die Abbildung zeigt die einzelnen Mutationen und ihre Lokalisation. Die rot markierten Mutationen (E258K, D770N, R943X, K1209K) wiesen neben dem bekannten kardialen Phänotyp der Kardiomyopathie eine leichte Muskelbeteiligung überwiegend im Sinne einer Gliedergürtelschwäche auf. Die mit dem Stern markierte Mutation R943X wurde erstmals von Tajsharghi et al. im Jahr 2009 bei einem zwei Monate alten Säugling mit einer Kardiomyopathie als auch einer nicht näher klassifizierten Skelettmuskelerkrankung in Verbindung gebracht.

Die nachfolgende Tabelle 12 zeigt einen weiteren Überblick über die Mutationen des *MYBPC3*-Gens, die in dem kardiologischen Patientenkollektiv gefunden wurden, mit genauer Lokalisation im Gen und den nachfolgenden funktionalen Effekten.

Mutation	Exon/Intron	Nukleotid- position	Lokalisation	Funktionale Effekte	Publikation
p.G148R	Exon 4	c.442G>A	Prolinreiche Region	Missense-Mutation	Hoedemakers, Caliskan et al. 2010
p.E258K	Exon 6	c.772G>A	Phosphorylierungsstelle	Spleißmutation Missense-Mutation Verlust Phosphorylierungsstelle	Niimura, Bachinski et al. 1998
IVS8+1G>A	Intron 7	c.821+1G>A	MYBPC3-Motiv	Verlust der Titin- und Myosin- Bindungsstelle	Niimura, Bachinski et al. 1998
p.D770N	Exon 23	c.2308G>A	C5-Aminosäureschleife	Spleiß- oder Missense-Mutation	Van Driest, Vasile et al. 2004
p.R1138P	Exon 31	c.3413G>C	Fibronectin III-Domäne	Missense-Mutation	<i>nicht publiziert</i>
p.K1209K	Exon 32	c.3627A>G	Myosinbindungsstelle	Spleißmutation Verlust der Myosin-Bindungsstelle	<i>nicht publiziert</i>

Tabelle 12: Übersicht über die Mutationen im MYBPC3-Gen, deren Lokalisation und die daraus folgenden funktionalen Effekte Die Mutationen p.R1138P (c.3413G>A) und p.K1209K (c.3627A>G) wurden von kardiologischer Seite erstmals beschrieben (Beckmann et. al, persönliche Mitteilung).

Die Patienten wurden zudem einer ausführlichen neurologischen Untersuchung unterzogen, deren Ergebnisse in Tabelle 13 zu finden sind.

	Mutation	Geschlecht	Alter bei Diagnose	Alter bei Symptombeginn	Erstsymptome	Familienanamnese	Kardio-myopathie	Kreatinkinase	Muskelkraft (MRC)		Muskel-trophik
									M.iliopsas	Rumpf	
1	G148R	weiblich	41	33	AP, Palpitation, Dyspnoe	fraglich	HOCM	normal	5	5	normal
2	E258K	männlich	45	19	verminderte Belastbarkeit	positiv	HOCM	< 3fach	5	5	normal
3	E258K	weiblich	bereits verstorben	4	prox. betonte Muskelschwäche	positiv	n. n.	normal	0	2	hypertroph
4	E258K	weiblich	69	67	plötzlicher Herztod	positiv	HOCM	normal	5	5	schmächtig
5	E258K	männlich	11	9	diskrete Kopfbeugerschwäche	positiv	HOCM	normal	5	4	normal
6	IVS8+1G>A	männlich	15	0,5	kongenitaler ASD	positiv	HCM	normal	5	5	normal
7	D770N	männlich	38	35	verminderte Belastbarkeit	positiv	HOCM	> 3fach	4	4	hypertroph
8	R1138P	männlich	59	51	Synkopen, Dyspnoe	fraglich	HCM	normal	5	5	normal
9	K1209K	männlich	38	15	verminderte Belastbarkeit	negativ	HOCM	< 3fach	4	5	hypertroph

Tabelle 13: Klinische Charakteristika des Indexpatienten (2), seiner Schwester (3), der gemeinsamen Mutter (4) und dem Sohn des Indexpatienten (5) mit dem Phänotyp einer HCM/HOCM und einer nachgewiesenen Mutation im MYBPC3-Gen Das Alter der Patienten ist in Jahren angegeben. ASD = Atriumseptumdefekt, n. n. = nicht nachweisbar.

Bei zwei der sechs untersuchten Patienten zeigte sich in der klinisch-neurologischen Untersuchung eine leichte Schwäche (MRC 3 bzw. 4) in der Beckengürtelmuskulatur, wobei das Anheben der Arme über den Kopf beiden Patienten ohne Einschränkung möglich war. Eine Scapula alata war nicht sichtbar. Gleichzeitig wiesen die beiden muskulär betroffenen Patienten auch eine ausgeprägte Wadenmuskulatur auf, was als Zeichen einer Pseudohypertrophie verstanden werden kann. Dem Patienten mit der Mutation p.D770N war zudem wegen einer ausgeprägten Schwäche der Rumpfmuskulatur das Aufrichten aus der Rückenlage zur sitzenden Position nur unter Zuhilfenahme der Arme möglich, was ebenfalls die Beteiligung der Skelettmuskulatur neben der kardialen Läsion unterstreicht. Auffällig bei der körperlichen Untersuchung beider Patienten war der adipöse und muskelhypotone Körperbau. Da sich die Patienten primär in kardiologischer Betreuung befanden, war bislang bei keinem der Patienten eine Skelettmuskelbiopsie erfolgt.

4.2 Analyse des *GNE*-Gens

Der Genlocus des *GNE*-Gens befindet sich auf Chromosom 9p12-p13 und besteht aus 12 Exons, wobei das erste nicht kodierend ist. Das *GNE*-Transkript ist ca. 700 kb groß und kodiert für ein aus 722 Aminosäuren bestehendes Protein (Eisenberg, I, Hochner H, 2001).

Insgesamt wurde bei 20 Patienten, die den klinischen Phänotyp einer distalen Myopathie aufwiesen und muskelbiopsisch eine Einschlusskörpermyopathie zeigten, eine Sequenzanalyse des *GNE*-Gens durchgeführt.

4.2.1 Patient 1: Die homozygote Mutation p.I587T

4.2.1.1 Klinische Daten des Patienten 1

Der aus Bulgarien stammende Patient bemerkte erstmals im Alter von 22 Jahren eine langsam zunehmende Atrophie seiner Wadenmuskulatur mit Unfähigkeit zum Zehen- und Fersengang. Vier Jahre später stellte sich auch Muskelschwund an beiden Händen ein. Zusätzlich zu seinem Steppergang hatte er sowohl Probleme beim Treppensteigen als auch eine langsam progrediente Schwäche der proximalen Muskulatur der unteren Extremität, wobei der M. quadriceps femoris weitgehend ausgespart blieb. Mit 30 Jahren war der Patient ohne Hilfsmittel nicht mehr gehfähig.

In der neurologischen Untersuchung des Patienten zeigten sich generalisierte atrophe Paresen der Muskulatur an oberer und unterer Extremität mit Werten zwischen 3-4/5 auf der MRC-Skala, wobei sowohl die Beugung und Streckung als auch die Rotation in den Hüftgelenken und die Plantarflexion bzw. Dorsalextension des Fußes mit MRC-Werten von 1-2/5 am stärksten betroffen war. Aus dieser bilateralen Parese der peronealen und tibialen Muskulatur resultierten starke Schwierigkeiten bei den erschwerten Gang- und Standproben. Der Patient war weder zum Zehenspitzen- noch zum Fersengang in der Lage. Zudem bewegte er sich nur unsicher mit Hilfsmitteln in Form eines watschelnden Stepperganges fort. Der Achillessehnen- und Radiusperiostreflex waren beidseits erloschen. Eine Atrophie der Thenar- und Hypothenarmuskulatur war ebenfalls zu erkennen.

In der Elektromyographie sah man ein myopathisches Muster mit distal symmetrischer Ausprägung und Betonung des M. tibialis anterior. Laborchemisch war eine relativ konstante Erhöhung der Serum-Kreatinkinase auf Werte um 500 U/l in den letzten 5 Jahren auffällig (Norm 180 U/l).

4.2.1.2 Mutationsanalyse

Bei der durchgeführten DNA-Analyse des Patienten 1 konnte ein homozygoter Basenaustausch von T zu C an der Nukleotidposition 1811 der cDNA im Exon 10 des *GNE*-Gens nachgewiesen werden, der an Codon 587 zu einer Aminosäuresubstitution von Isoleucin zu Threonin führt (p.I587T bzw. c.1811T>C). Somit befindet sich die Mutation in der Kinase-Domäne des bifunktionellen Enzyms und wurde erstmals im Jahre 2003 von Eisenberg und Kollegen bei einer US-amerikanischen Familie beschrieben (Eisenberg, Grabov-Nardini et al. 2003).

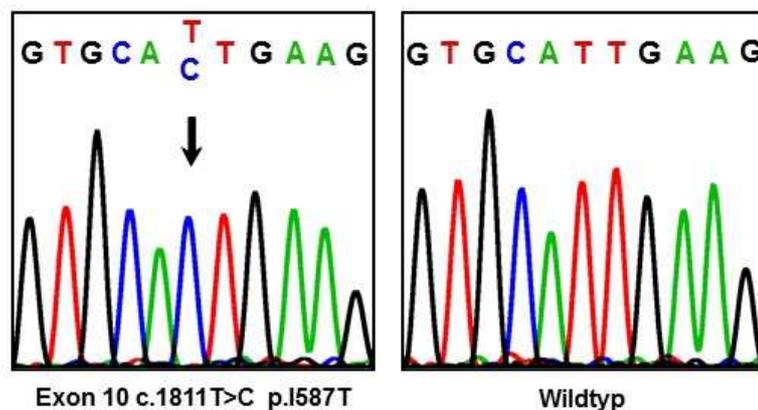


Abbildung 8: Ausschnitt aus dem Elektropherogramm der Sequenzanalyse von Exon 10 des *GNE*-Gens. Links ist die Analyse der Patienten-DNA mit dem homozygoten Basenaustausch 1811T>C dargestellt, der zu der Mutation p.I587T führt, rechts der gleiche DNA-Abschnitt einer Normalkontrolle.

4.2.2 Patient 2: Zusammengesetzt heterozygote Mutationen p.R246W und p.I587T

4.2.2.1 Klinische Daten des Patienten 2

Die bulgarische Patientin, die dem Volksstamm der Roma angehört, bemerkte bei ihrer ersten Schwangerschaft im Alter von 17 Jahren leichte Gangschwierigkeiten mit Unfähigkeit zum Zehen- und Fersengang mit Betonung der linken Seite. Allerdings war diese Schwäche der distalen Beinmuskulatur nur langsam progredient, sodass sie erst sieben Jahre später während ihrer zweiten Schwangerschaft eine weitere Verschlechterung bemerkte. Zu diesem Zeitpunkt stellten sich ausgeprägte Schwierigkeiten beim Treppensteigen sowie eine beginnende Schwäche der proximalen Muskulatur beider Arme ein. Sie bewegte sich in Form eines Stepperganges fort.

In der neurologischen Untersuchung fand sich eine muskuläre Hypotonie des gesamten Körpers mit bilateralen Atrophien sowohl beider Ober- und Unterschenkel als auch der Thenar- und Hypothenarmuskulatur. Am ausgeprägtesten waren die Atrophien am *M. tibialis anterior* beider Beine.

Die manuelle Kraftprüfung an der oberen Extremität zeigte leichte, symmetrische Paresen aller Muskelgruppen mit Werten von 4/5. Einzig die Kniegelenksexension beider Beine war der Patientin ohne Probleme mit voller Kraft möglich (MRC 5/5). Die restlichen Bewegungen der unteren Extremität waren gegen leichten Widerstand und gegen die Schwerkraft möglich (MRC 3-4/5). Am schwersten ausgeprägt war die Parese des *M. tibialis anterior* beidseits mit 2/5 auf der MRC-Skala. Daraus resultierte ein Stepper- und Watschelgang der jungen Patientin. Die erschwerten Gang- und

Standproben waren deshalb nicht durchführbar; das Aufrichten aus der Hocke war der Patientin nur unter Durchführung des Gowers-Manövers möglich. Bei den Muskeigenreflexen waren der Achillessehnenreflex beidseits erloschen und der Radiusperiotreflex symmetrisch stark abgeschwächt. Die restlichen MER waren beidseits mittellebhaft auslösbar; pathologische Reflexe waren nicht erhältlich.

Das Elektromyogramm lieferte myopathische Veränderungen in nahezu allen Muskeln der oberen und unteren Extremität sowohl proximal als auch distal. Die stärksten Veränderungen zeigten sich im M. tibialis anterior, M. interosseus dorsalis I und M. biceps brachii.

In der durchgeführten Kernspintomographie der Muskeln beider Beine zeigte sich ein stark verminderter Durchmesser der glutealen Muskulatur und der medialen und dorsalen Beckengürtelmuskulatur. Die Adduktoren waren stärker betroffen als die anderen Muskelgruppen. In der T1-Wichtung stellte sich die Muskulatur der Hüfte, der medialen Adduktoren und der dorsalen Flexoren hyperintens dar, was als Äquivalent zum subkutanen und interfaszialen Fettgewebe zu werten ist und dem Hinweis auf eine fettige Degeneration der Muskulatur entspricht. Einzig der M. quadriceps femoris beider Beine wies einen vergrößerten Durchmesser im Sinne einer Hypertrophie auf.

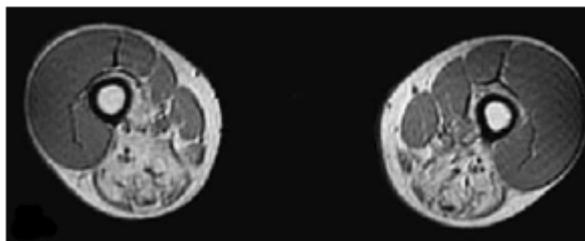


Abbildung 9: MRT der Oberschenkel (T1 Wichtung) eines 30jährigen Vergleichspatienten mit nachgewiesener homozygoter *GNE*-Mutation Es zeigt sich die fettige Degeneration der dorsalen Oberschenkelmuskulatur mit Aussparung des M. quadriceps femoris bds. Abbildung übernommen von Krause et al. (Krause, Schlotter-Weigel et al. 2003).

Da die zu diesem Zeitpunkt 26jährige Patientin, also nach einer Krankheitsdauer von ca. 10 Jahren, auch eine langsam progrediente Belastungsdyspnoe entwickelte, erhielt sie zusätzlich eine echokardiografische Untersuchung. Dabei zeigte sich eine geringgradig eingeschränkte linksventrikuläre Pumpfunktion mit einer Ejektionsfraktion (LVEF) von 50% mit geringer diffuser Hypokinesie. Zusammen mit der diastolischen Dysfunktion bzw. Relaxationsstörung kann der Befund als Zeichen einer beginnenden dilatativen Kardiomyopathie verstanden werden.

Laborchemisch fand sich bei der Patientin nahezu immer eine normwertige Serum-Kreatinkinase mit Werten um die 160 U/l (Norm 180 U/l). Familienanamnestisch waren der Patientin keine Muskelerkrankungen von Verwandten erinnerlich.

4.2.2.2 Mutationsanalyse

Auch bei der zweiten bulgarischen Patientin wurde aufgrund ihrer ausgeprägten Klinik, der auffälligen Befunde im Muskel-MRT und in der EMG-Untersuchung und nicht zuletzt aufgrund der ethnischen Zugehörigkeit eine Sequenzanalyse der 12 Exons des *GNE*-Gens und der flankierenden intronischen Regionen durchgeführt.

Dabei zeigten sich zwei heterozygote Mutationen: Zum einen litt die Patientin unter der gleichen Mutation wie Patient A, der Veränderung p.I587T (c.1811T>C) im Exon 10, allerdings in heterozygoter Ausprägung (Abbildung 10).

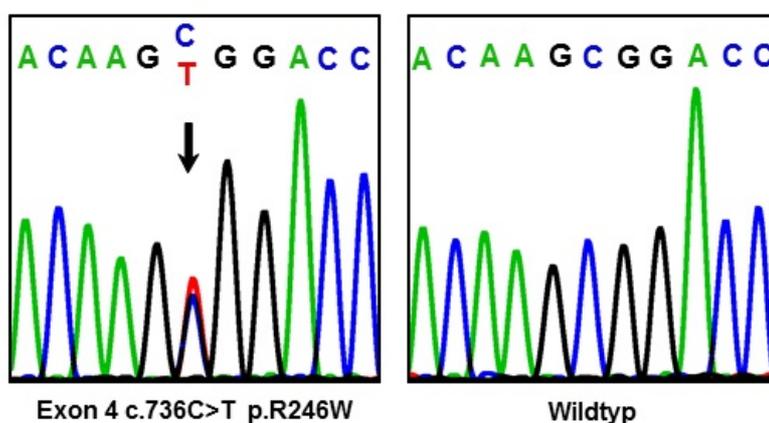


Abbildung 10: Ausschnitt aus dem Elektropherogramm der Sequenzanalyse von Exon 4 des *GNE*-Gens Links ist mit einem Pfeil die heterozygote Mutation p.R246W im Exon 4 gekennzeichnet; rechts ist derselbe DNA-Abschnitt einer gesunden Normalkontrolle gezeigt.

Zum anderen ließ sich auf Exon 4 in Position 736 ein Basenaustausch C>T nachweisen, der im Codon 246 zu einem Aminosäureaustausch von Arginin zu Tryptophan führt (p.R246W bzw. c.787C>T). Die Patientin hat damit eine Aminosäuresubstitution sowohl in der Kinase- als auch Epimerase-Domäne des bifunktionellen Enzyms.

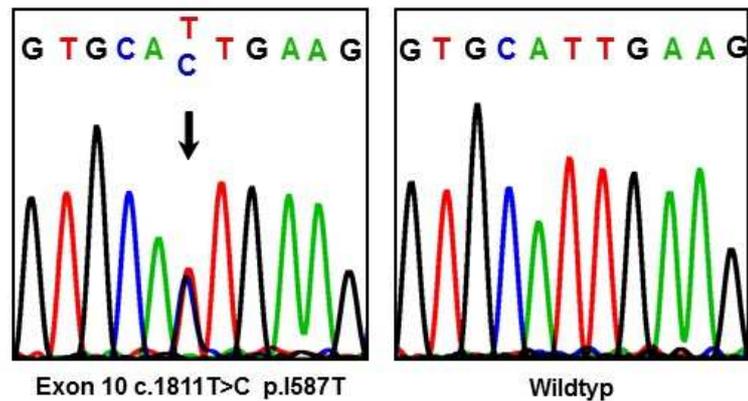


Abbildung 11: Ausschnitt aus dem Elektropherogramm der Sequenzanalyse von Exon 10 des *GNE*-Gens In der linken Abbildung zeigt der Pfeil die Mutation p.I587T in heterozygoter Ausprägung. Auf der rechten Seite findet sich die Sequenz einer nicht betroffenen Kontrollperson.

Da bei der Patientin eine vermutlich krankheitsverursachende Mutation in der DNA-Analyse des *GNE*-Gens gefunden wurde und die Patientin drei Geschwister hat, wurde auch von diesen DNA asserviert und untersucht, um eine ggf. hereditäre Form der Einschlusskörpermyopathie zu detektieren. Bei den zwei Schwestern und dem jüngeren Bruder der Patientin, die sich alle klinisch unauffällig präsentierten, lag jeweils die I587T-Mutation heterozygot vor. Die Eltern der Patientin wurden nicht untersucht; klinische Daten waren von ihnen ebenfalls nicht erhältlich.

4.2.3 Proteinexpression des *GNE*-Gens in transient transfizierten Zellen

Die Proteinexpression von GNE in transient transfizierten HeLa- bzw. C2C12-Zellen wurde durch Western-Blot-Experimente überprüft. Die beschriebenen Versuche wurden sowohl mit dem GNE-Wildtyp als auch der häufigsten GNE-Mutante M712T durchgeführt. Zusätzlich wurde ein weiteres Konstrukt in die Betrachtung miteingeschlossen, das GNE mit einem mutierten potentiellen nukleären Exportsignal (NES) enthielt.

Bisherige Studien zur Immunlokalisierung des GNE-Wildtyps lieferten meist ein prominentes Kernsignal. Allerdings war die Stärke des Signal variabel, sodass eine unterschiedliche Regulation und die Funktion von GNE als nukleozytoplasmatisches Shuttle-Protein vermutet wurde (Krause, Hinderlich et al. 2005).

Da der Zellkern eukaryontischer Zellen von einer Doppelmembran umgeben ist, müssen verschiedene zelluläre Mechanismen existieren, um einen

nukleozytoplasmatischen Austausch zu gewährleisten. Einerseits geschieht dies bei kleinen Proteinen unter 40 kDa durch passive Diffusion entlang des Konzentrationsgradienten (Kaffman and O'Shea 1999), andererseits durch einen aktiven, rezeptor-vermittelten Prozess bei größeren Molekülen. Dabei wird der Export über spezifische Signale in dem Transportsubstrat vermittelt, welche als nukleäre Exportsignale bezeichnet werden und eine Interaktion mit einem Exportrezeptor eingehen können. Charakteristisch für diese Signale ist der hohe Gehalt an hydrophoben Gruppen, insbesondere der Aminosäuren Leucin und Isoleucin (Moroianu 1998).

4.2.3.1 GNE im pLXSN-Vektor

Für den Western-Blot wurden die Proteinextrakte von transient mit einem GNE-Konstrukt transfizierten Zellen elektrophoretisch aufgetrennt und die Proteine nach abgeschlossener Gelelektrophorese immunologisch durch einen entsprechenden polyklonalen Kaninchen-GNE-Antikörper (1:700, HPA007045, Sigma) sichtbar gemacht. Dabei zeigten sich charakteristische Banden bei der bekannten molekularen Masse von GNE von 79 kDa. Der erste Western-Blot, der in Abbildung 12 gezeigt ist, lieferte interessanterweise eine Doppelbande bei der Mutante M712T, die auch in den nachfolgenden Experimenten bestätigt werden konnte.

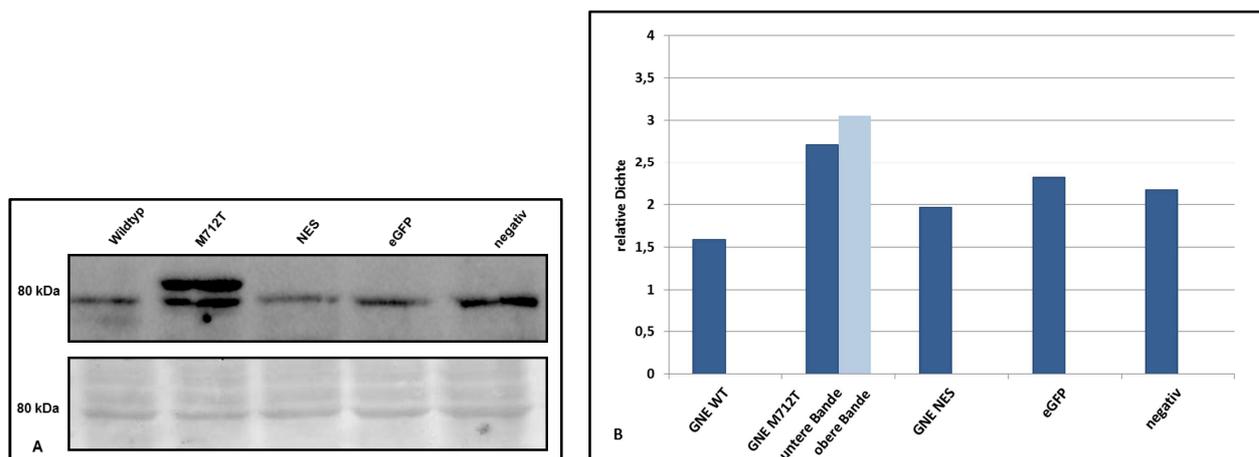


Abbildung 12: A Western Blot (oben) und Ponceau S-Färbung (unten) transfizierter HeLa-Zellen im pLXSN-Vektor HeLa-Zellen wurden mit den angegebenen Konstrukten transfiziert, nach 1 Tag lysiert und mit dem polyklonalen Kaninchen-GNE-Antikörper (1:700, HPA007045, Sigma) im Western Blot analysiert. Der Blot zeigte Banden bei der erwarteten molekularen Masse von GNE (79 kDa). Bei der M712T-Mutante fand sich eine Doppelbande. Als Kontrolle wurde ein Gesamtproteinlysate Mock-transfizierter (d. h. untransfizierter) HeLa-Zellen aufgetragen. **B** Das Säulendiagramm zeigt die densitometrische Auswertung des Blots. Die Werte wurden auf eine prominente Bande der Ponceau S-Färbung normalisiert. Es zeigt sich ein deutlich intensiveres Signal der oberen Bande der M712T-Mutante.

Eine der beiden Banden wies die gleiche Größe wie das endogene GNE auf. Die zweite Bande zeigte ein etwas größeres apparentes Molekulargewicht, was möglicherweise für eine posttranslationale Modifikation spricht.

Die Bande der Negativkontrolle, also der nicht transfizierten HeLa-Zellen, wies ein ähnlich starkes Signal wie die Banden der mit den NES- und eGFP-GNE-Konstrukten transfizierten Zellen auf. Es ist zu beachten, dass mit dem GNE-Antikörper nicht zwischen endogenem GNE und GNE-Konstrukten differenziert werden kann.

Bei der Transfektion des eGFP-GNE-Konstrukts ließ sich eine Bande bei ca. 80 kDa detektieren, was der molekularen Masse von endogenem GNE entspricht. Da das eGFP-Tag eine Masse von 27 kDa aufweist, sollte der GNE-Antikörper ein eGFP-GNE-Fusionskonstrukt zwischen 100 bis 110 kDa detektieren. Da dies nicht der Fall war, kann davon ausgegangen werden, dass nur das endogene GNE detektiert wurde.

Die semiquantitative Densitometrie der einzelnen Banden des Western-Blots und die der jeweils zugehörigen Bande der Ponceau S-Färbung wurden mit Hilfe des Bildbearbeitungsprogramm ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>, 2014) durchgeführt. Anschließend wurden die ermittelten Werte in Relation zueinander gesetzt, sodass eine semiquantitative Aussage über die Proteinexpression getroffen werden konnte.

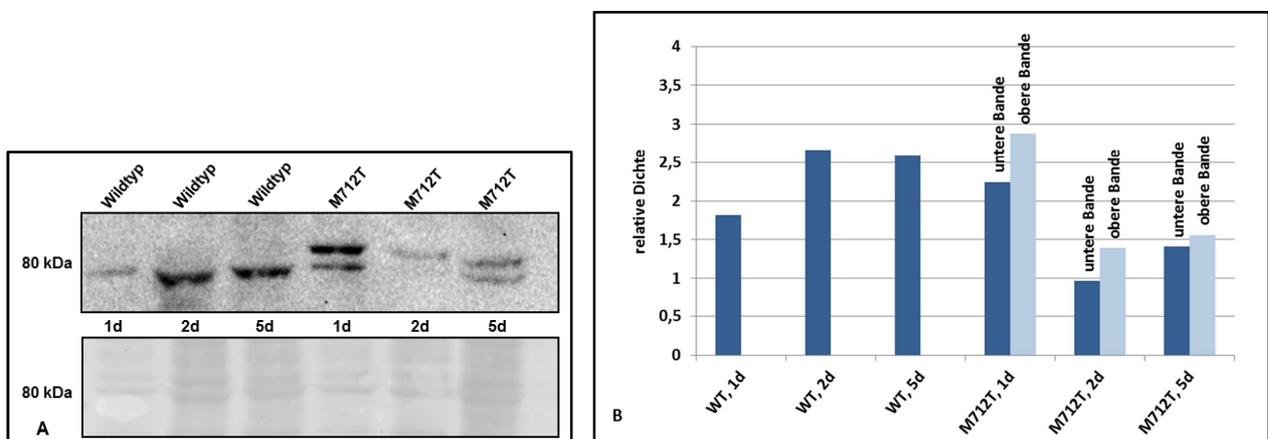


Abbildung 13: A Western Blot und Ponceau S-Färbung transfizierter HeLa-Zellen zu drei verschiedenen Zeitpunkten Auch hier wurden der GNE-Wildtyp und die Mutante M712T im pLXSN-Vektor verwendet. Die Immunoblot-Detektion erfolgte wieder mit dem polyklonalen GNE-Antikörper. **B** Bei der densitometrischen Analyse des Blots zeigte sich stets ein relativ stärkeres Signal der oberen Bande der M712T-Mutante im Vergleich zur unteren 79 kDa-Bande.

Um den idealen Zeitpunkt festzustellen, an dem sich die beste Expression der Konstrukte in den Western-Blot-Experimenten der HeLa-Zelllinie mit dem GNE-Konstrukt zeigt, wurden weitere Experimente im Zeitverlauf mit den Konstrukten GNE-

Wildtyp und GNE-M712T durchgeführt (siehe Abbildungen 13 und 14). Auch hier war die charakteristische Doppelbande der Mutante an allen Tagen im untersuchten Zeitverlauf sichtbar, sodass auch hier der oben erwähnte interessante Mechanismus einer möglichen posttranslationalen Modifikation als Ursache vermutet wurde.

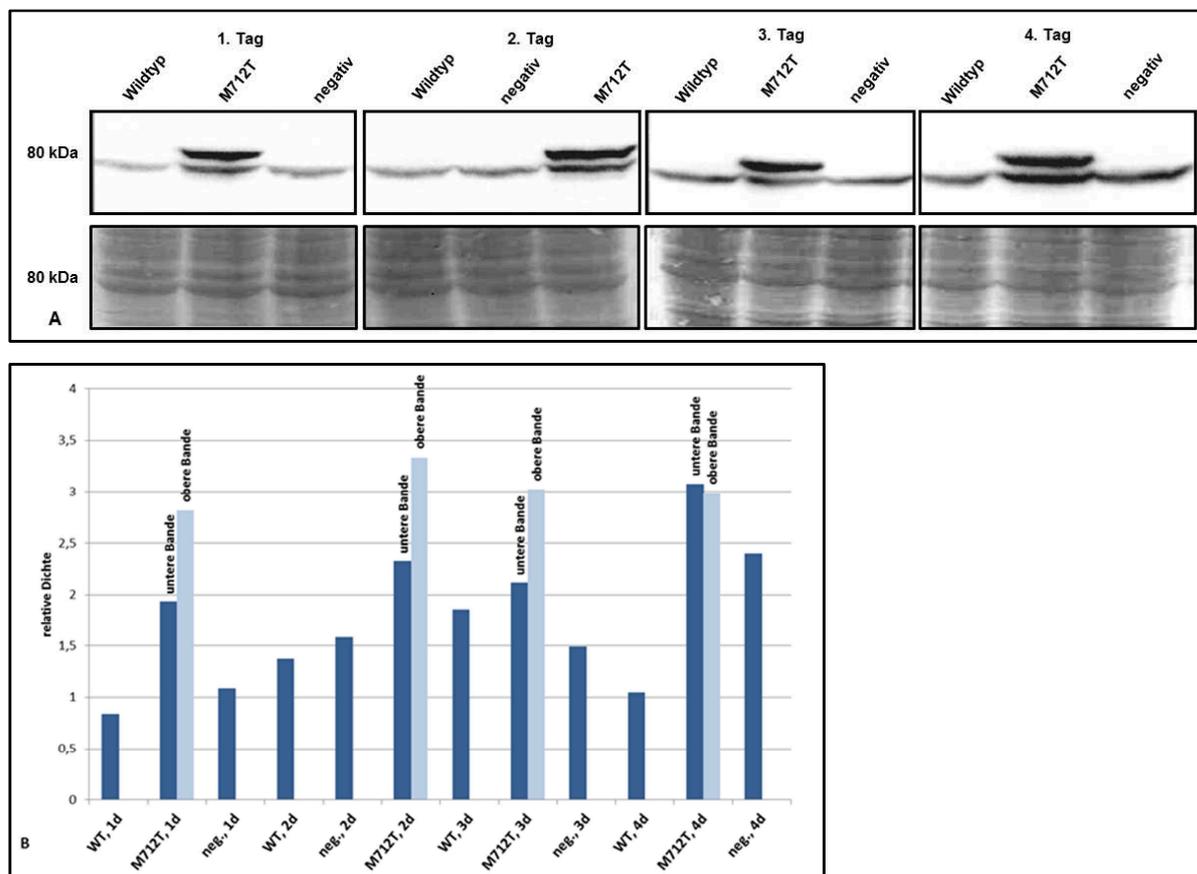


Abbildung 14: A Western Blot und Ponceau S-Färbung transfizierter HeLa-Zellen Auch hier zeigte sich sowohl die schon beschriebene Doppelbande der Mutante als auch das annähernd gleiche GNE-Signal der Negativkontrolle und des Wildtypkonstrukts zu allen vier untersuchten Zeitpunkten. Die untere der beiden Doppelbanden nahm bei dem M712T-Konstrukt relativ zu. **B** zeigt die entsprechende densitometrische Analyse des Blots.

Allerdings blieb in diesen Experimenten offen, ob auch endogenes GNE modifiziert wurde. Hinweise auf eine Überexpression von GNE fanden sich konsistent nur mit dem M712T-Konstrukt (Abbildung 12 A und 14 A). Dagegen war in den mit dem Wildtyp transfizierten Zellen das Signal der GNE-Bande meist vergleichbar stark wie in den untransfizierten Zellen.

4.2.3.2 GNE in neuen Vektoren: pCMV-myc und pCMV-HA

Da durch die Vorversuche vermutet wurde, dass der pLXSN-Vektor die Proteinexpression von GNE in den HeLa-Zellen beeinflussen könnte und um weitere Nachweismethoden für das GNE-Protein unabhängig von einem GNE-spezifischen Antikörper zu etablieren, wurde die GNE-cDNA in neue Vektoren kloniert und mit neuen Epitop-Tags fusioniert. Beide Transfektionsserien wurden sowohl an den schon bekannten HeLa-Zellen durchgeführt, aber auch an C2C12-Zellen, um die Expression in myogenen Zellen zu vergleichen.

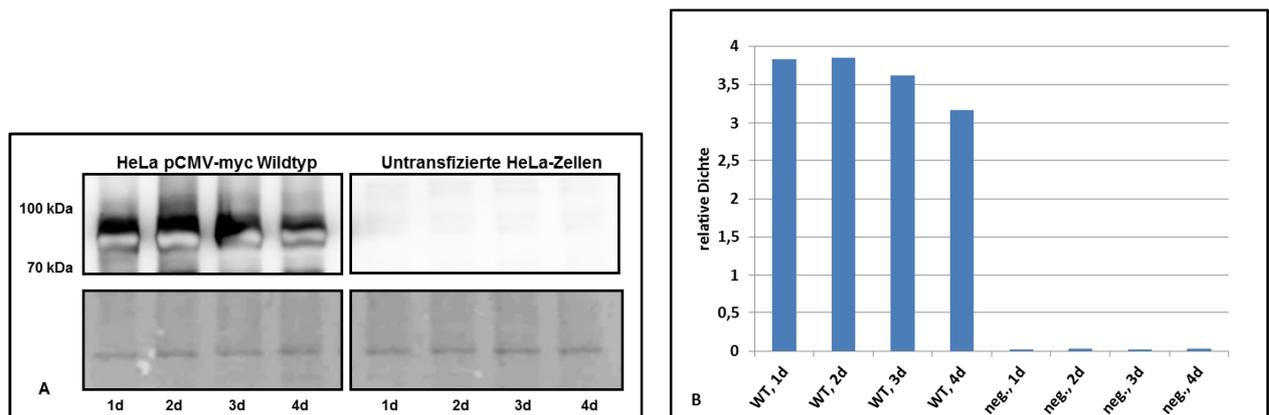


Abbildung 15: A Western-Blot (oben) und Ponceau S-Färbung (unten) von transfizierten HeLa-Zellen mit GNE-WT im pCMV-myc-Vektor. Zu sehen ist der Zeitverlauf der Expression des myc-GNE-Wildtyps und das fehlende myc-Antikörper-Signal in der Negativkontrolle an vier aufeinanderfolgenden Tagen. **B** Die Messung der relativen Dichte der Banden aus Blot und Ponceau S-Färbung bestätigten dieses Expressionsmuster.

Zunächst wurde das GNE-Wildtyp-Konstrukt im pCMV-myc-Vektor getestet. Dabei zeigte sich sowohl bei den HeLa- als auch bei den C2C12-Zellen ein starkes spezifisches Signal mit dem anti-myc-Antikörper; die untransfizierten Negativkontrollen blieben dagegen an allen Beobachtungstagen erwartungsgemäß ohne Signal (Abbildung 15). Die Konzentration des anti-myc-Antikörpers war in dem HeLa-Zell-Experiment mit 1:100 etwas zu hoch konzentriert, worauf die weiße Komponente der Banden hinweist, die an dieser Stelle auf einen kompletten Verbrauch des luminogenen Substrats schließen lässt. Eine Konzentration von 1:500 (Abbildung 16) bzw. sogar 1:1000 war zusammen mit einer niedrigeren Konzentration des analysierten Gesamtproteins pro Gelspur von 5 anstatt von 10 µg besser geeignet.

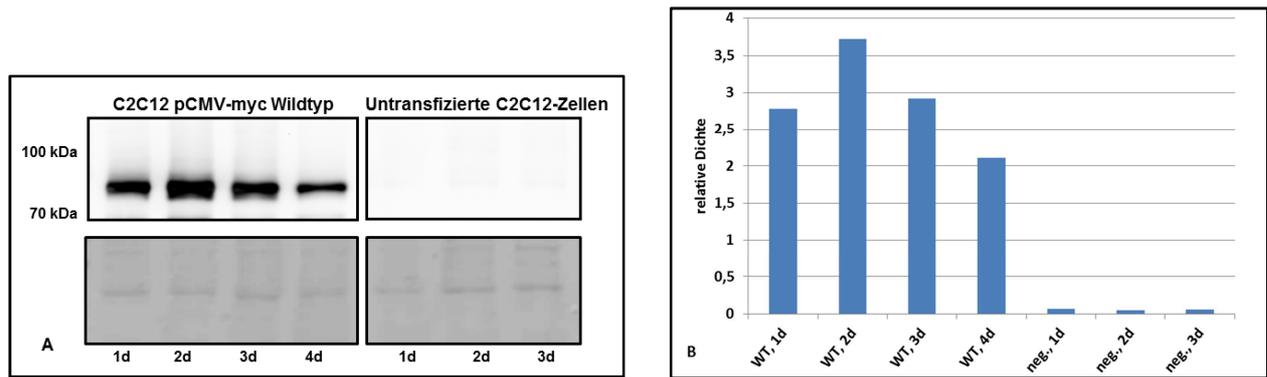


Abbildung 16: A Western-Blot (oben) und Ponceau S-Färbung (unten) von C2C12-Zellen im pCMV-myc-Vektor In diesem zweiten Transfektionsexperiment wurde der sekundäre Antikörpers stärker verdünnt eingesetzt (1:500) und ein quantifizierbares Expressionssignal beobachtet. Das Optimum der Expression war am zweiten Tag nach Transfektion, wobei die Bande am Tag 1 auch schon ein starkes Signal aufwies. Auch hier zeigte sich keinerlei unspezifische Bindung des anti-myc-Antikörpers in der Negativkontrolle. Die Kontrolle des vierten Tages konnte durch einen technischen Fehler leider nicht in die Betrachtung mitaufgenommen werden. **B** Die densitometrische Analyse der einzelnen Banden bestätigte die stärkste Expression an Tag 2 mit einer relativen Dichte von 3,7.

Weiterführend wurden die Zellen auch noch mit einem GNE-Wildtyp-Konstrukt im pCMV-HA-Vektor transfiziert. Das kurze HA-Epitop-Tag leitet sich von einem Oberflächen-Glykoprotein, dem humanen Influenza-Haemagglutinin, ab und entspricht den Aminosäuren 98-106. Auch hier wurde die Expression des HA-GNE-Wildtyps nach Transfektion in HeLa und C2C12-Zellen mit entsprechenden Negativkontrollen im Zeitverlauf betrachtet (Abbildungen 17 und 18). Allerdings zeigte sich bereits bei den untransfizierten HeLa-Zellen der Negativkontrolle eine unspezifische Bande, so dass sich das HA-Tag in HeLa-Zellen als ungeeignetes Epitop-Tag für die quantitative Expressionsanalyse erwies.

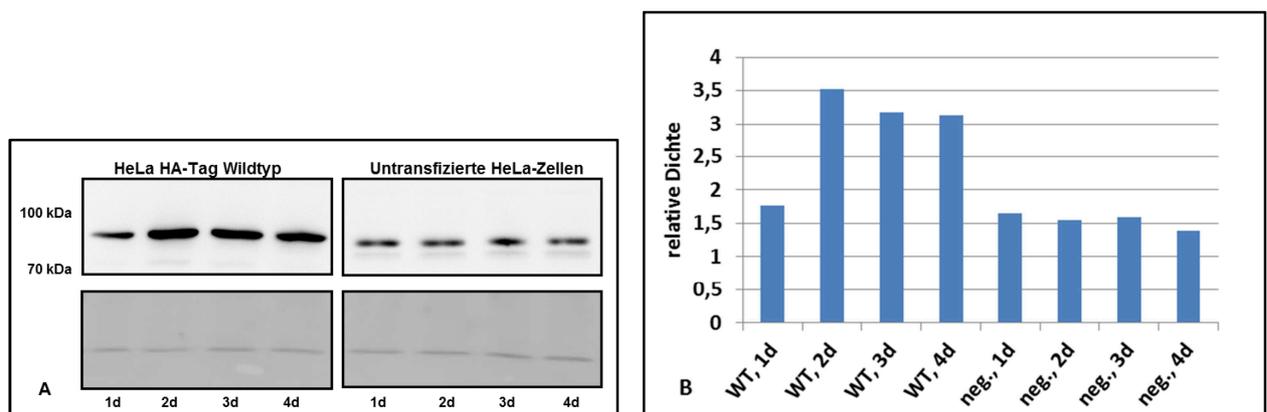


Abbildung 17: A Western-Blot (oben) und Ponceau S-Färbung (unten) von HeLa-Zellen transfiziert mit dem HA-GNE WT-Konstrukt Betrachtet wurde ein Zeitverlauf der Proteinexpression über vier aufeinanderfolgende Tage. Als primärer Antikörper wurde ein polyklonaler Kaninchen-HA-Antikörper (1:1500) verwendet. Das Expressionsmaximum des HA-GNE-Wildtyp-Fusionsproteins zeigte sich an Tag 2. **B** Die densitometrische Analyse bestätigte die unspezifische Bande der nicht-transfizierten Zellen, die eine annähernd gleiche Intensität wie das HeLa-HA-WT-Konstrukt an Tag 1 zeigte.

Dagegen war die Expression des GNE wt-Konstrukts mit dem HA-Tag in C2C12-Zellen sehr spezifisch nachzuweisen (Abbildung 18) und zeigte eine ähnliche Expressionskinetik wie in den Transfektionsexperimenten mit dem pCMV-myc-Vektor.

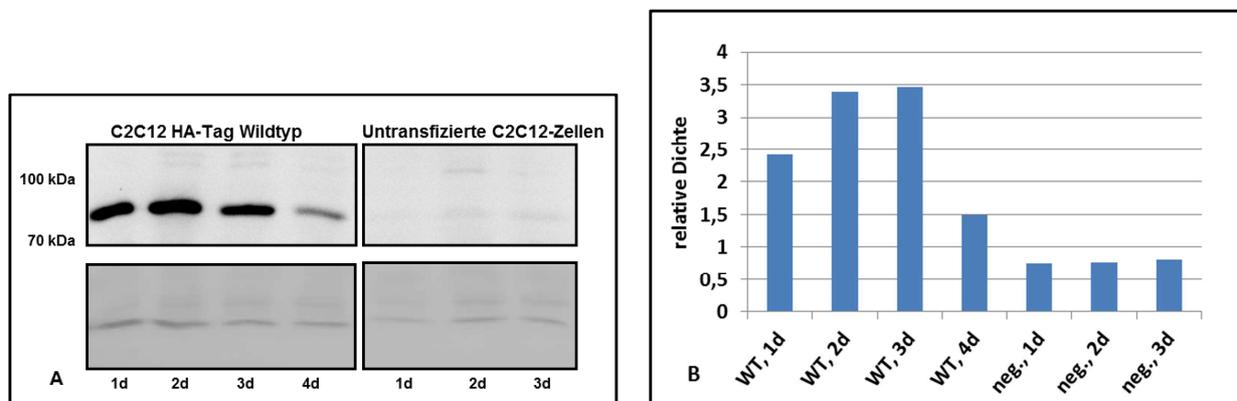


Abbildung 18: A Western-Blot und Ponceau S-Färbung von C2C12-Zellen transfiziert mit dem HA-GNE WT-Konstrukt. Es zeigte sich ebenfalls ein Expressionsoptimum an Tag 2 nach der Transfektion. In den Negativkontrollen fand sich kein unspezifisches Signal mit dem polyklonalen HA-Antikörper. Aufgrund eines technischen Fehlers fiel Tag 4 der Negativkontrolle aus. **B** Auch hier bestätigte die densitometrische Analyse die unspezifische Bande.

4.2.4 Subzelluläre Lokalisation von GNE in der Zelle

Um die spezifische subzelluläre Lokalisation von GNE zu analysieren, wurde eine Immunfluoreszenz-Analyse von Zelllinien (HeLa, C2C12) durchgeführt.

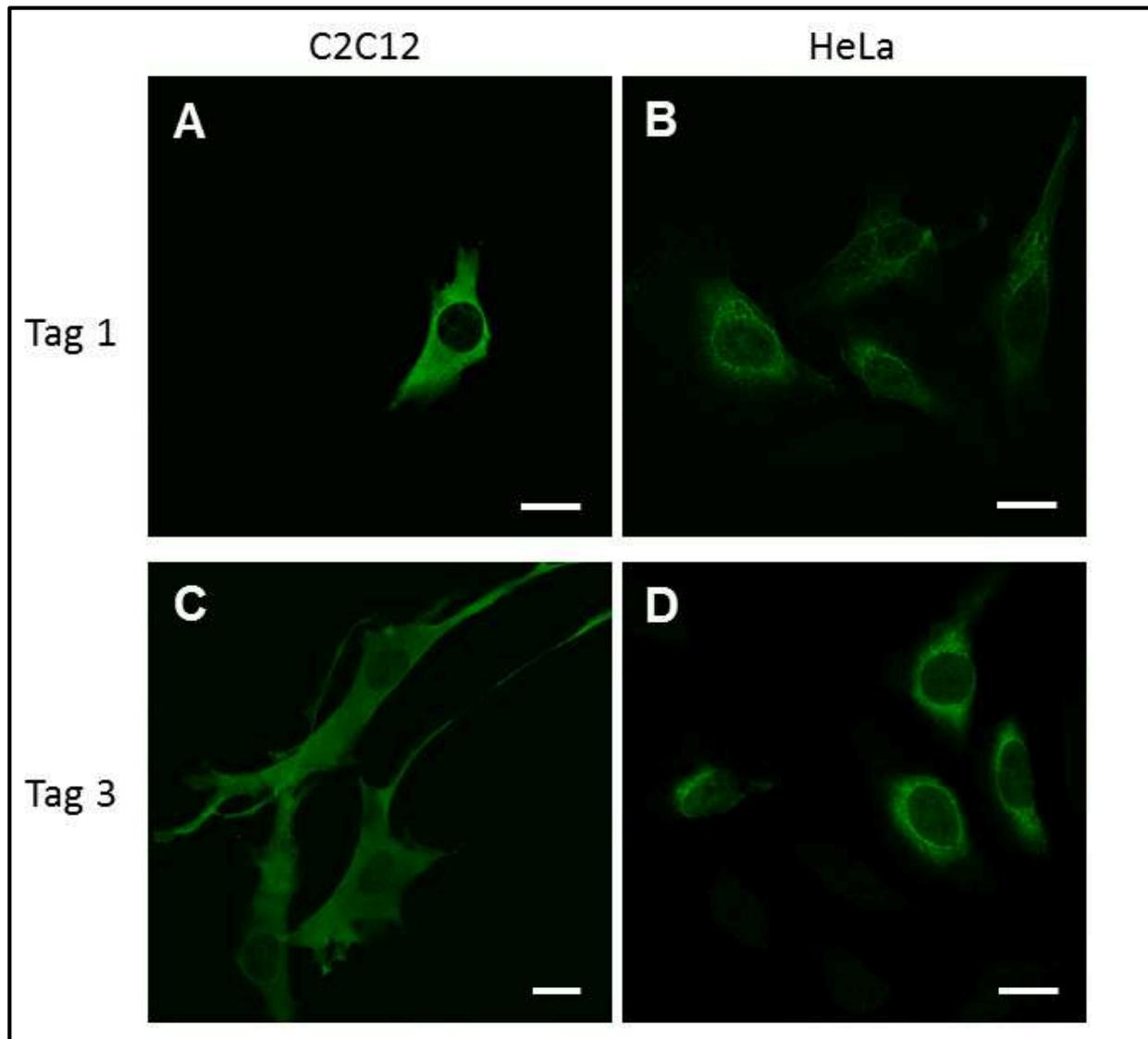


Abbildung 19: Konfokale Immunfluoreszenzmikroskopie von C2C12- und HeLa-Zellen nach Transfektion mit dem myc-GNE Wildtyp-Konstrukt und myc-Epitop-Antikörperfärbung In C2C12-Zellen findet sich sowohl an Tag 1 (**A**) und an Tag 3 (**C**) ein weit verteiltes zytoplasmatisches Signal, während der Zellkern eine schwächere, netzartige GNE-Färbung zeigt. Bei HeLa-Zellen ist eine ähnliche Verteilung mit perinukleärer Betonung sichtbar, die im Zeitverlauf etwas an Intensität zunimmt (**B und D**). Maßstabsbalken 10 μm .

4.3 Analyse des *HDAC6*-Gens

Das *HDAC6*-Gen besitzt 29 Exons, von denen das erste nicht codierend ist und auf dem Chromosom Xp11.23 lokalisiert ist. Das von Grozinger und Kollegen 1999 identifizierte Enzym kodiert für ein 131 kD Protein mit 1216 Aminosäuren (Grozinger, Hassig et al. 1999).

4.3.1 Auswahl des Patientenkollektivs

Insgesamt wurde bei 23 Patienten eine molekulargenetische Analyse des *HDAC6*-Gens durchgeführt. Von den 23 Patienten waren 11 (47,8%) weiblichen und 12 (52,2%) männlichen Geschlechts, die zwischen 27 und 91 Jahren alt waren (Mittelwert $51,5 \pm 18,3$). Weitere klinische Daten sind der Tabelle 6 zu entnehmen.

Die Patienten wurden von uns ausgewählt, da sie klinisch das Bild einer sporadischen bzw. erblichen Form einer Einschlusskörpermyopathie aufwiesen, das dem von Patienten mit Mutationen im *VCP*-Gen glich. Eine genetische Analyse dieses Gens allerdings brachte keine wegweisenden Resultate. Aufgrund der bekannten Interaktionen des Chaperon-Komplexes p97/VCP mit *HDAC6* beim Abbau von Proteinaggregaten (Li, Jiang et al. 2011) wurde die Hypothese überprüft, ob Veränderungen im *HDAC6*-Gen eine mögliche Ursache für degenerative Muskelerkrankungen mit Proteinaggregaten sein können. Bislang gab es laut Datenbankrecherche keine Erkrankung, die auf assoziierte Varianten im Kandidatengen *HDAC6* zurückzuführen ist, sodass das Verfolgen dieses neuen Ansatzes sinnvoll und innovativ war.

<i>Variable (n=23)</i>	<i>Ergebnis</i>
weibliches Geschlecht	11
männliches Geschlecht	12
Alter bei Symptombeginn, Jahre	51,5 ± 18,3
Muskelschwäche	
Kraft Fingerflexoren	
normal (MRC=5)	5
vermindert (MRC=3 oder 4)	12
schwach (MRC=0, 1 oder 2)	6
Kraft M. deltoideus	
normal (MRC=5)	6
vermindert (MRC=3 oder 4)	14
schwach (MRC=0, 1 oder 2)	3
Kraft M. quadriceps femoris	
normal (MRC=5)	5
vermindert (MRC=3 oder 4)	12
schwach (MRC=0, 1 oder 2)	6
Kraft Hüftbeuger	
normal (MRC=5)	3
vermindert (MRC=3 oder 4)	13
schwach (MRC=0, 1 oder 2)	7
Serum-Kreatinkinase	
normal	5
< 3facher Normwert	9
> 3facher Normwert	9
Grad der Gehbehinderung	
keine Hilfsmittel	7
Gehstützen oder Rollator	12
Rollstuhl	4
Muskelbiopsie, n=16	
IBM	4
Vakuoläre Myopathie	8
Diffuse interstitielle Polymyositis	4

Tabelle 14: Charakteristika der 23 Patienten für die HDAC6-Kandidatengenanalyse Test der manuellen Muskelkraft anhand der Skala des Medical Research Council (MRC). Bei 16 der insgesamt 23 Patienten lag ein Muskelbiopsiebefund vor.

4.3.2 Ergebnisse der molekulargenetischen Untersuchungen im *HDAC6*-Gen

4.3.2.1 Polymorphismus IVS3-10delT

In der direkten Sequenzanalyse des Untersuchungskollektivs fand sich im intronischen Bereich vor Exon 4 des *HDAC6*-Gens bei jedem Patienten eine heterozygote Sequenzvariante. Deswegen wurde bei 5 gesunden Kontrollpersonen ebenfalls eine Genanalyse durchgeführt, wo sich dieselbe Abweichung zeigte. Es handelte sich hierbei um den bereits bekannten Polymorphismus IVS3-10delT (SNP-ID rs190360216, <http://www.genecards.org>, 2014). Dabei fand sich in der intronischen Sequenz, die auch als IVS (intervening sequence) bezeichnet wird, 10 Nukleotide vor Beginn des vierten Exons eine einzelne heterozygote Deletion (del) eines Thymidin-Rests (T).

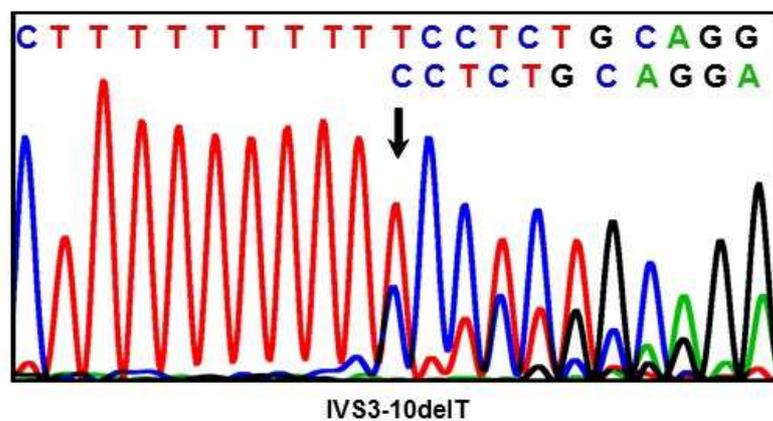


Abbildung 20: Ausschnitt aus dem Elektropherogramm der Sequenzanalyse vor dem Exon 4 des *HDAC6*-Gens. Es zeigt sich der Polymorphismus IVS3-10delT.

4.3.2.2 Polymorphismus IVS19-72delAA

Auch vor dem Exon 20 fand sich bei den 23 neuromuskulär auffälligen Patienten und den 5 gesunden Kontrollpersonen eine Variante in der Sequenz, die in den Datenbanken bisher noch nicht gelistet wurde. Analog zu dem bereits vor Exon 4 beschriebenen Polymorphismus zeigte sich auch hier in der intronischen Sequenz vor dem 20. Exon eine Deletion von zwei Adenosin-Resten in heterozygoter Ausprägung und wird damit als IVS19-72delAA bezeichnet.

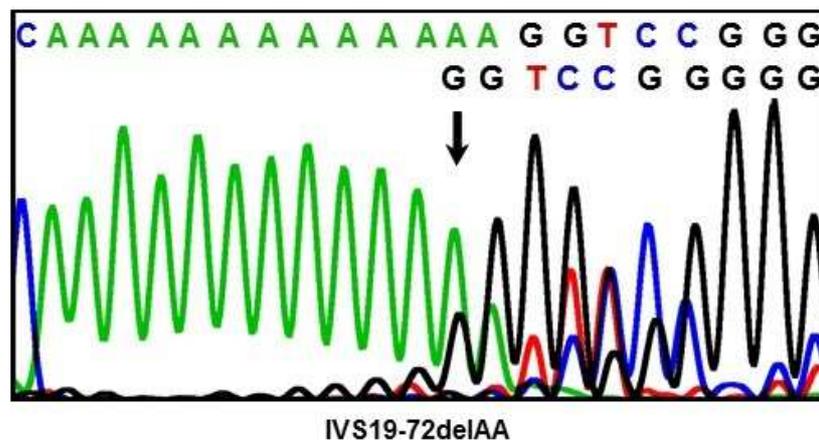


Abbildung 21: Ausschnitt aus dem Elektropherogramm der Sequenzanalyse vor Exon 20 des *HDAC6*-Gens. Es zeigte sich der Polymorphismus IVS19-72delAA.

5 DISKUSSION

5.1 Das *MYBPC3*-Gen in der neuromuskulären Diagnostik

5.1.1 Genotyp-Phänotyp-Korrelation der Indexpatienten

Der Indexpatient IV, 2 entwickelte erstmals im Alter von 19 Jahren diagnostisch feststellbare Kriterien einer hypertrophen obstruktiven Kardiomyopathie. Da vor allem bei familiären Formen Mutationen der Gene *MYH7* (schwere Kette des kardialen β -Myosins), *TNNT2* (kardiales Troponin T) und des *MYBPC3* (kardiales Myosin-Bindeprotein) häufig ursächlich sind (Schlossarek, Mearini et al. 2011), wurde bei dem Patienten eine PCR-Analyse der drei Gene durchgeführt und die heterozygote Mutation p.Glu258Lys im *MYBPC3*-Gen detektiert. Auch familienanamnestisch konnten Fälle von plötzlichem Herztod und malignen Rhythmusstörungen eruiert werden, die auf einen autosomal-dominanten Erbgang der Erkrankung deuteten. Da der Patient den Tod seiner beiden Geschwister im Rahmen einer schweren Muskelerkrankung miterlebt hatte, stellte er sich zur genetischen Beratung mit der Frage vor, ob seine Herzerkrankung und die Gliedergürteldystrophie seiner Geschwister in Zusammenhang stehen könnten. Da seine verstorbene Schwester während ihrer langjährigen muskulären Erkrankung auch in regelmäßigen Abständen kardiologische Untersuchungen erhielt, war ersichtlich, dass sie Zeit ihres Lebens an keiner klinisch fassbaren Kardiomyopathie oder einer anderer Form der Myokardbeteiligung durch die Muskelerkrankung gelitten hat. Eine aus einem asservierten Muskelschnitt gewonnene DNA-Probe wurde *post mortem* in unserem Labor untersucht und lieferte die überraschende Erkenntnis, dass auch diese Patientin unter derselben Mutation wie ihr Bruder im *MYBCP3*-Gen litt. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass die dominante Mutation auch ursächlich an ihrer Gliedergürteldystrophie beteiligt gewesen ist.

5.1.2 Next-Generation-Sequencing zur Analyse von Kandidatengen

Um eine weitere Eingrenzung von Kandidatengen bei hereditären Skelettmuskelerkrankungen mit kardialer Beteiligung vorzunehmen, wurde das Exom des Indexpatienten, seiner Schwester und der gemeinsamen Eltern durch Next-Generation-Sequencing auf pathogene Sequenzvarianten untersucht.

Wegen der Fülle an Sequenzvarianten, die bei der Exom-Analyse gefunden werden, war es notwendig, für die anschließende weitere Betrachtung eine Eingrenzung auf sinnvolle Kandidatengene vorzunehmen. Dabei zeigte sich, dass insbesondere bei der Schwester des Indexpatienten eine Vielzahl von SNPs in diesen Kandidatengenen vorlagen, die alle bisher allerdings nicht als pathogen beschrieben wurden. Dennoch ist es möglich, dass in diesen analysierten Genen trotzdem krankheitsverursachende Varianten vorliegen, da hauptsächlich die kodierenden Bereiche mit angrenzenden intronischen Sequenzen betrachtet wurden. Veränderungen tief in den intronischen Sequenzen oder auch große Deletionen oder Insertionen bleiben auch durch diese Analyse unentdeckt. Des Weiteren waren viele der vorliegenden Veränderungen noch nicht oder nur mit einer sehr geringen Häufigkeit beschrieben worden, sodass noch keine genaue Kenntnis über einen möglichen Pathogenitätsmechanismus vorlag und somit auch keine Aussage über einen krankheitsverursachenden Wert der Veränderung gegeben werden konnte.

Weitere Auswertestrategien untersuchten die Gesamtexom-Daten der Familie nach Varianten die jeweils heterozygot bei der Mutter bzw. beim Vater zu finden waren; homozygot bei der Schwester, aber nicht homozygot beim Indexpatienten. Diese Analyse wie auch die Suche nach relevanten *de novo*-Mutationen bei der Schwester lieferten keine wegweisenden Resultate.

Es zeigte sich, dass von bioinformatischer Seite keine Algorithmen zur Verfügung standen, die zuverlässig alle zusammengesetzt heterozygoten Varianten herausfiltern konnten. Dieser Ansatz wäre weiterführend unter der Hypothese, dass die schwer betroffene, verstorbene Schwester des Indexpatienten möglicherweise an einer zusätzlichen rezessiven Erkrankung litt, bei der jeweils ein pathogenes Allel von der Mutter und eines vom Vater stammte. Deshalb wurden gezielt nicht-synonyme SNPs in möglichen Kandidatengenen bei allen vier Familienmitgliedern im IGV-Genome Browser überprüft. Diese Auswertestrategie ergab schließlich zwei entsprechende Varianten im Titin-Gen.

Insgesamt wäre die Erkrankung der schwer betroffenen Schwester des Indexpatienten vereinbar mit der Klinik einer Muscular dystrophy, limb-girdle, type 2J (MIM#608807). Bisher ist für diesen Phänotyp nur eine homozygot vorliegende Mutation im Titin-Gen in einer konsanguinen finnischen Familie beschrieben worden, in der allerdings keine respiratorische Beteiligung auftrat. Es kann angenommen werden, dass auch zusammengesetzt heterozygote pathogene Sequenzvarianten im *TTN*-Gen zu einem

Skelettmuskelphänotyp führen könnten. Charakteristisch für die beschriebene LGMD2J ist ein Beginn im Kindesalter. Es bleibt zu klären ob die identifizierten Varianten unter anderem im Titin-Gen eine pathogene Relevanz haben.

5.1.3 Vergleich von neuromuskulären (LGMD-) und kardiologischen (HOCM-) Patientenkollektiven

Ausgehend von der Annahme, dass Veränderungen im *MYBPC3*-Gen eventuell auch zu einem Skelettmuskelphänotyp führen könnten, wurden weitere Patienten und deren Familien rekrutiert, die ebenfalls den Phänotyp einer autosomal-dominant vererbten Gliedergürtelschwäche aufwiesen, aber bislang noch keiner genetischen Variante in einem der bekannten ursächlichen Gene für eine Gliedergürteldystrophie zugeordnet werden konnten. Auch bei ihnen wurde eine Sequenz-Analyse des *MYBPC3*-Gens durchgeführt, wobei sich aber keine pathogene Sequenzvariante feststellen ließ. Deswegen wurde das Kollektiv um Patienten erweitert, die unter einer Kardiomyopathie litten. So wurden sechs kardiologische Patienten einer eingehenden klinisch-neurologischen Untersuchung unterzogen, um eine mögliche Skelettmuskelbeteiligung aufzudecken. Die sechs Patienten, einschließlich unseres Indexpatienten, wiesen alle eine molekulargenetisch gesicherte Mutation im *MYBPC3*-Gen auf. Zwei der Sequenzvarianten (c.3413G>A bzw. p.R1138P und c.3627A>G bzw. p.K1209K) waren dabei neu und erstmals beschrieben worden (Beckmann et al., persönliche Mitteilung), sodass noch keine Referenzliteratur dazu zu finden war. Die verbleibenden vier Mutationen waren schon vorher in der Literatur diskutiert worden, darunter auch die Mutation des Indexpatienten und seiner Familie p.E258K.

Der Patient mit der Mutation p.D770N (c.2308G>A) wies in der klinischen Untersuchung am eindrucklichsten eine Schwäche der Muskulatur des Rumpfes und des Beckengürtels auf. Van Driest entdeckte die Mutation als erstes in einer Kohorte von 389 nicht-verwandten Patienten mit dem Phänotyp einer hypertrophen Kardiomyopathie (Van Driest, Vasile et al. 2004). Im Gegensatz zur p.E258K-Mutation handelt es sich bei der p.D770N-Mutation nicht um eine Spleißstellenmutation, sondern um eine reine Missense-Mutation, bei der die saure Aminosäure Aspartat gegen die neutrale Aminosäure Asparagin ausgetauscht wird.

Um hinsichtlich der bislang nicht beschriebenen Sequenzvariante p.K1209K (c.3627A>G) eine Vorhersage bezüglich der Pathogenität treffen zu können, wurde

erneut eine Auswertung mit der Software MutationTaster durchgeführt. Dabei wurde mit einer Wahrscheinlichkeit von $p=0,9999$ die Vorhersage „disease causing“ getroffen, wobei p -Werte nahe dem Wert 1 mit einer hohen Vorhersagewahrscheinlichkeit korrelieren. Zudem wurde die Veränderung in einer kanonischen Spleißstelle des Moleküls gefunden, sodass es als wahrscheinlich angesehen wird, dass der normale Spleißvorgang durch die Sequenzvariante beeinträchtigt ist und somit die Translation in ein normales Proteinprodukt gestört ist. Somit kann man hier von einem ähnlichen Pathomechanismus wie bei der p.E258K-Mutation ausgehen, die ebenfalls eine Spleißstellenmutation darstellt.

5.1.4 Bedeutung der Sequenzvariante

Die Variante p.Glu258Lys (p.E258K, c.772G>A), die bei dem Indexpatienten, seiner Schwester und der gemeinsamen Mutter durch PCR-Analyse identifiziert wurde, ist bereits von zahlreichen, verschiedenen Arbeitsgruppen als eine Ursache für eine HCM/HOCM beschrieben worden (Niimura, Bachinski et al. 1998; Alders, Jongbloed et al. 2003; Erdmann, Daehmlow et al. 2003; Nanni, Pieroni et al. 2003; Richard, Charron et al. 2003; Andersen, Havndrup et al. 2004; Van Driest, Vasile et al. 2004; Kimonis and Watts 2005; Olivotto, Girolami et al. 2008; Girolami, Ho et al. 2010). Der genaue Pathomechanismus konnte bislang allerdings noch nicht aufgeklärt werden, sodass zwei Modelle existieren, um die Bedeutung der Mutation zu erklären.

Zum einen betrifft die Variante eine hochkonservierte Aminosäure, die in der Nachbarschaft zum MYBPC3-Motiv liegt, das die vier herzspezifischen Phosphorylierungsstellen beinhaltet und damit eine bedeutende funktionelle Rolle in der Modulierung der Herzkontraktion einnimmt. *MYBPC3* wird normalerweise durch adrenerge Stimulation durch zwei Proteinkinasen phosphoryliert, was zu einer erhöhten systolischen Wandspannung führt (Gautel, Zuffardi et al. 1995). Nanni et al. sahen die pathophysiologische Relevanz der p.E258K-Variante in der inkorrekten Phosphorylierung, die über einen dominant negativen Effekt zu fehlender Wandspannung und damit eingeschränkter Energiegewinnung führt (Nanni, Pieroni et al. 2003).

Zum anderen wurde aber auch die Bedeutung als Spleißvariante diskutiert, da die Veränderung die letzte Aminosäure im Exon 6 betrifft, wodurch es zu einer Veränderung der Spleißsignale kommen kann, die den RNA-Spleißvorgang stört und

zur Synthese eines veränderten Proteins führen könnte. Vor allem die Arbeitsgruppe um Andersen hat sich mit dieser Theorie der Haploinsuffizienz vermehrt auseinandergesetzt (Andersen, Havndrup et al. 2004). Ihrer Ansicht nach führt die Variante zu einer Leserasterverschiebung (frameshift) mit Ausbildung eines vorzeitigen Stopp-Codons. Das dadurch entstehende Translationsprodukt ist damit zu kurz, um eine effektive Sarkomerintegration zu erreichen. Damit liegt nach Ansicht von Andersen und Kollegen die Pathogenität eher in einem quantitativen als in einem qualitativen Defizit des Sarkomers. Die verkürzten Spleißvarianten wurden in dieser Studie aber nur in Leukozyten und nicht in humanem kardialen Gewebe nachgewiesen. Damit könnte es sich auch um Artefakte aufgrund der ektopen Expression handeln, weshalb weiterführende Studien an Myokardbiopsien zusätzliche aufklärende Informationen erbringen könnten.

Alders und Kollegen konnten die p.E258K-Variante mit einem besonders frühen Beginn und einem äußerst schweren klinischen Phänotyp in Verbindung bringen: der Indexpatient verstarb mit 17 Jahren am plötzlichen Herztod (Alders, Jongbloed et al. 2003).

In einer italienischen Studie wurde die Mutation bei 27 von 203 untersuchten Patienten aus Florenz und Rom gefunden und somit als „founder-mutation“ der italienischen Bevölkerung angegeben. An diesem Patientenkollektiv zeigte sich eine relativ heterogene kardiale Morphologie und klinische Präsentation, obwohl alle dieselbe Sequenzvariante aufwiesen (Olivotto, Girolami et al. 2008).

Welcher Mechanismus bei *MYBPC3*-Mutationen, insbesondere bei der von uns gefundenen p.E258K-Mutation, auch zu einer Skelettmuskelbeteiligung führen könnte, ist bislang unklar, da bisher nur ein Fall beschrieben wurde, der eine Verknüpfung zwischen Herz und Skelettmuskel bei *MYBPC3*-Mutationen zeigt (Tajsharghi, Leren et al. 2010). Es fand sich eine ektopre Expression der kardialen Isoform im Muskel, die dort analog zu ihrem Pathomechanismus im Herz zu einer Desorganisation im Sarkomer und damit zur partiellen Deletionen der dicken Filamente führte.

5.1.5 Klinische Relevanz der genetischen Analyse

Auch wenn eine Herzbeteiligung bei vielen Muskeldystrophien eine häufige klinische Manifestation ist, war eine Verbindung zwischen Mutationen im Myosin-bindenden Protein und einer Gliedergürtelschwäche bislang nur einmal beschrieben worden. Die

schwedische Arbeitsgruppe um Tajsharghi berichtete 2009 von einem 2 Monate alten weiblichen Säugling, der sowohl an einer schweren neonatalen hypertrophen Kardiomyopathie als auch an einer klinisch nicht näher klassifizierten Myopathie der Skelettmuskeln litt (Tajsharghi, Leren et al. 2010). Eine Muskelbiopsie des M. quadriceps femoris lieferte ausgeprägte myopathische Veränderungen mit zahlreichen kleinen Fasern, die die kardiale Isoform des Myosin-bindenden Proteins ektop exprimierten. In der Genanalyse des Kindes fand sich schließlich die homozygote Mutation p.R943X im *MYBPC3*-Gen.

Bei unserer Indexfamilie bestand ebenfalls die Möglichkeit, dass sowohl der kardiale als auch der muskuläre Phänotyp durch dieselbe Mutation im *MYBPC3*-Gen sein könnte. Eine weiterführende genetische Analyse der wichtigsten Kandidatengene durch Gesamt-Exomanalyse lieferte vor allem bei der Schwester eine Vielzahl von SNPs, die in der Mehrzahl aber als nicht-pathogen eingestuft wurden. Die pathogenetische, funktionelle Auswertung zweier zusammengesetzt heterozygoter Varianten im Titin-Gen bleibt abzuwarten.

Auch wenn es uns nicht möglich war, die Verknüpfung der beiden Krankheitsbilder der Kardiomyopathie und der Gliedergürteldystrophie an weiteren Patienten zu beweisen und es sich damit – sollten beide Erkrankungen durch dieselbe Mutation bedingt sein – eher um eine sehr seltene Manifestation handelt, soll dennoch das Bewusstsein gestärkt werden, dass ein gleichzeitiges Auftreten beider Erkrankungen möglich ist. Klinische Beobachtung und frühzeitige Behandlung von kardialen Komplikationen sind für betroffene Patienten von außerordentlicher Bedeutung im Hinblick auf Morbidität und Mortalität. Auch wenn Muskeldystrophien zu einer verminderten Lebensqualität und einem gewissen Grad an körperlicher Behinderung führen, so ist es doch die Herzbeteiligung, die das Überleben des Patienten durch Herzinsuffizienz und maligne Arrhythmien limitiert.

Das Erkennen einer Herzbeteiligung bei neurologischen Patienten bzw. einer Skelettmuskelbeteiligung bei Kardiomyopathien bedarf einer gründlichen Untersuchung und der aktiven Mitarbeit des behandelnden Arztes. Die Schwierigkeit liegt dabei oftmals in der Anbindung des Patienten an spezielle Herz- oder Muskelzentren, bei denen das Bewusstsein für das jeweilige andere Fachgebiet an Priorität verloren hat und vorwiegend fachspezifisch untersucht und behandelt wird. Außerdem präsentieren sich betroffene Patienten oft atypisch, da bei einem herzinsuffizienten Patienten die fehlende Belastbarkeit und Beweglichkeit eher auf das hohe NYHA-Stadium als auf

eine Skelettmuskelbeteiligung zurückgeführt werden kann. Auch bei neuromuskulären, oft immobilen Patienten kann eine kardiale Beteiligung möglicherweise verkannt werden. Deswegen sollte bei der Erstdiagnose einer Muskeldystrophie oder bei einer entsprechend positiven Familienanamnese in regelmäßigen Abständen eine kardiologische Diagnostik in Form von Ruhe-EKG, Echokardiographie und ggf. Belastungsergometrie durchgeführt werden. Bei in erster Linie internistisch erkrankten Personen mit Auffälligkeiten in der neurologischen Untersuchung oder der Familienanamnese empfiehlt sich die Bestimmung der Serum-Kreatinkinase, die Untersuchung mittels Elektromyographie oder bei begründetem Verdacht die Durchführung einer Muskelbiopsie.

Prospektive Studien an einem größeren Patientenkollektiv wären sinnvoll, um gegenwärtige Behandlungsstrategien zu evaluieren und neue Leitlinien für die Diagnostik und Therapie von Patienten mit Varianten im *MYBPC3*-Gen zu entwickeln.

5.2 Einordnung der molekulargenetischen und zellbiologischen Untersuchung des *GNE*-Gens

5.2.1 Mutationen im *GNE*-Gen

5.2.1.1 Phänotyp-Genotyp-Korrelation der betroffenen Patienten 1 und 2

Bei dem Patienten 1 konnte ein homozygoter Basenaustausch T zu C in Position 1811 des Exon 10 identifiziert werden, der an der Position 587 zu einem Aminosäureaustausch von Isoleucin zu Threonin führt. Da die Mutation homozygot vorliegt, muss also eine Kopie der Mutation von jedem Elternteil vererbt worden sein. Die Mutation wurde erstmals im Jahr 2003 von Eisenberg et al. bei einer US-amerikanischen und einer italienischen Familie beschrieben (Eisenberg, Grabov-Nardini et al. 2003) und tritt gehäuft in der Roma-Population auf (Sahai, Baris et al. 2005). Die häufigste homozygote Mutation M712T wurde 2001 ebenfalls von Eisenberg in der Volksgruppe der persischen Juden gefunden (Eisenberg, Avidan et al. 2001).

Der klinische Verlauf von Patient 1 ist als relativ typisch anzusehen. Mit einem Erkrankungsalter von 22 Jahren und nur langsam progredientem Fortschreiten der Muskelschwäche liegt er in der Norm der beschriebenen Patienten. Im Vordergrund standen auch bei ihm die Paresen der unteren Extremität mit Betonung des anterioren Kompartiments, sodass er unter dem charakteristischen Steppergang litt. Insgesamt

dauerte es bei ihm ca. 8 Jahre bis er so schwer betroffen war, dass Hilfsmittel in Anspruch genommen werden mussten, was auch an dem im Krankheitsverlauf relativ gut erhaltenen M. quadriceps femoris liegen mag. Auch die Thenaratrophy mit Schwierigkeiten, kleine Gegenstände sicher zu greifen und zu halten, wurde ebenfalls bei Personen mit einer GNE-Myopathie vorbeschrieben (Sahai, Baris et al. 2005). Die Höhe der Kreatinkinase kann abhängig vom Individuum und dem Beanspruchungsgrad der Muskulatur stark schwanken, sodass auch der leicht erhöhte Wert von 500 U/l mit dem klinischen Bild einer GNE-Mutation gut vereinbar ist.

Die Patientin 2 ist Träger einer zusammengesetzt heterozygoten Mutation: I587T in Exon 10 und R246W in Exon 4. Die heterozygote Ausprägung von I587T fanden Eisenberg und Kollegen in einer italienischen, konsanguinen Familie (Eisenberg, Grabov-Nardini et al. 2003). Diese Mutation trat gemeinsam mit einem heterozygoten Basenaustausch im Exon 4 auf (c.736C>T), was zu einer Aminosäuresubstitution von Arginin zu Tryptophan im Codon 246 des Enzyms führt. Die Mutation wurde 2002 von Darvish bei einer kalifornischen Patientin mit irischer Abstammung das erste Mal gefunden (Darvish, Vahedifar et al. 2002). Eine Kombination aus diesen beiden Mutationen ist bisher noch nicht beschrieben worden, weshalb davon ausgegangen werden muss, dass es sich um eine relativ seltene Manifestation handelt.

Der Krankheitsverlauf von Patientin 2 gestaltete sich sehr typisch; primär fiel ihr selbst eine Gangstörung auf, die sich vor allem wegen der Fußheberparese und der voll erhaltenen Kraft der Quadricepsmuskulatur gut in das Bild einer hereditären Einschlusskörpermyopathie einfügt. Der Krankheitsbeginn mit 17 Jahren ist etwas früh, doch der Verlauf über Jahre hinweg mit erhaltener Gehfähigkeit typisch. Auch der Befund der Kernspintomographie beider Beine ist klassisch. Beim kardiologischen Befund der Patientin zeigte sich zusätzlich eine diastolische Relaxationsstörung im Sinne einer dilatativen Kardiomyopathie. Nishino und Kollegen beschrieben im Jahr 2005 bei ihrem Patientenkollektiv in 18% der Fälle eine kardiale Beteiligung unterschiedlicher Schwere bis hin zum plötzlichen Herztod (Zucman-Rossi, Benhamouche et al. 2007). Zudem wurde bei einem Geschwisterpaar kaukasischer Abstammung, die beide an einer GNE-Myopathie litten auch eine Kardiomyopathie festgestellt (Chai, Bertorini et al. 2011). Der genetische Befund lieferte auch hier in beiden Fällen eine zusammengesetzte Heterozygotie (p.F528C und p.A631V) und die Echokardiographie Hinweise auf eine dilatative Kardiomyopathie.

Die in dieser Arbeit neu beschriebene Kombination zweier bekannter *GNE*-Mutationen p.R246W und p.I587T führte somit ebenfalls zu dem phänotypischen Bild einer hereditären Einschlusskörpermyopathie mit möglicher Beteiligung des Herzens in Form von einer Kardiomyopathie.

5.2.1.2 Bedeutung der Ethnizität und Häufigkeit in Bevölkerungsgruppen

Die *GNE*-Myopathie ist eine extrem seltene Erkrankung, bei der die genaue Kenntnis der Prävalenz zur Entwicklung eines klinischen Studiendesigns und einer möglichen kausalen Therapie äußerst hilfreich wäre. Khademian et al. schätzten die Prävalenz auf gerade 1-3 betroffene Personen pro Million Einwohner weltweit (Khademian, Mehravar et al. 2012). Wichtig ist bei der Beurteilung der Häufigkeit die ethnische Zugehörigkeit des Patienten: die Population der persischen Juden scheint von Mutationen im *GNE*-Gen am häufigsten betroffen zu sein. Eine Studie von Kaback et al. im Jahr 2010 zeigte, dass bei den in Los Angeles (Kalifornien, USA) lebenden Juden persischen Ursprungs 9,2% (92/1000) an einer asymptomatischen heterozygoten Mutation leiden (Kaback, Lopatequi et al. 2010). Aufgrund des hohen Vorkommens der Mutation M712T in der Persisch-jüdischen Volksgruppe wurde diese als „founder mutation“ bezeichnet. Die Prävalenz liegt hier bei 3,91% (31/792) für einen heterozygoten und 0,31% (5/792) für einen homozygoten Basenaustausch (Khademian, Mehravar et al. 2012). Im asiatischen Raum, v. a. unter Japanern, liegt die Häufigkeit der Mutationen mit 1,7-3,5 Betroffenen pro Million Einwohner zwar sehr viel niedriger, aber auch hier konnte eine „founder mutation“ eruiert werden: p.V572L im Exon 10 (Arai, Tanaka et al. 2002).

5.2.1.3 Stellenwert der genetischen Diagnostik

Durch die vorliegende Arbeit konnte gezeigt werden, dass *GNE*-Mutationen zwar selten sind, sich aber immer wieder Patienten finden, die aufgrund ihrer Muskelerkrankung einem starken Leidensdruck ausgesetzt sind. Deswegen ist es von großer Relevanz für den betroffenen Personenkreis und deren Familien, aber auch für die praktisch tätigen Ärzte, dass bei typischem klinischen Phänotyp viele Patienten mit unterschiedlichen Genvarianten zielorientiert charakterisiert werden. Durch die 82 bislang detektierten *GNE*-Mutationen kann bereits ein breites Spektrum der auftretenden Mutationen sowohl genetisch als auch phänotypisch abgedeckt werden, was das Erkennen von betroffenen

Personen erleichtert und deren zumeist sehr langen Leidensweg vom Symptombeginn bis hin zur Diagnosestellung verkürzt. Dennoch muss aber das Bewusstsein für diese seltene Erkrankung bei den klinisch tätigen Ärzten geschärft werden, sodass ein Patient mit dem Phänotyp einer GNE-Myopathie erkannt und einer genetischen Diagnostik zugeführt wird. Diese Diagnostik ist zumeist nicht nur für den Patienten selbst, sondern auch für seine Familie von essentieller Bedeutung, da es sich vorwiegend um hereditäre Erkrankungen handelt, die vererbt werden können. Deswegen ist auch die weiterführende humangenetische Beratung des Patienten bezüglich seiner Familienplanung nach Aufdecken einer krankheitsverursachenden Genvariante dringend angeraten. Durch die Anbindung an spezialisierte Muskelzentren kann den betroffenen Patienten die Heil- und Hilfsmittelversorgung erleichtert werden, die im langen Verlauf der Erkrankung meist erforderlich wird. Auch hierbei ist es sinnvoll, den weiteren Krankheitsverlauf des Patienten durch Vergleich mit einem Patientenkollektiv, das an derselben Mutation leidet, abzuschätzen, auch wenn interindividuelle Unterschiede, wie so häufig in der Medizin, immer gegeben sind.

5.2.1.4 Therapeutische Ansatzmöglichkeiten

Da derzeit noch keine kausalen Therapieverfahren für Patienten mit einer GNE-Myopathie verfügbar sind, ist die Kenntnis eines möglichst großen Personenkreises mit einer speziellen Mutation von besonderer Bedeutung, um eventuell klinische Studien zur Etablierung einer medikamentösen Therapie zu initiieren. Bisher haben verschiedene Tiermodelle vielversprechende Behandlungsansätze ergeben.

Galeano et al. entwickelten GNE-Knock-in Mäuse, die die häufige Mutation M712T trugen ($GNE^{M712T/M712T}$). Überraschenderweise starben die meisten Mäuse innerhalb der ersten 72 Stunden nach der Geburt an einem schweren glomerulären Schaden der Nieren: die Mäuse litten an glomerulärer Hämaturie und Proteinurie, einer Podozytopathie und einer Aufspaltung der Basalmembran. Zusätzlich zeigte sich eine verminderte Sialylierung des Podocalyxin, dem häufigsten Glykoprotein der Podozyten. Gleichzeitig wiesen die Mäuse zwar eine verminderte GNE-Epimerase-Aktivität im Muskel auf, eine Muskelschwäche war aber nicht apparent. Durch Gabe von *N*-Acetylmannosamin (ManNAc), einem Vorläufer der Sialinsäure, konnte das Überleben von 43% der Mäuse verlängert werden (Galeano, Klootwijk et al. 2007), was als möglicher therapeutischer Ansatz auch bei Menschen verstanden werden kann, bei denen zwar

eine renale Manifestation bei *GNE*-Mutationen unbekannt ist, die Hyposialylierung aber auch einen möglichen Anteil an der Krankheitsentstehung im Muskel hat.

Die Hyposialylierung wird auch von Malicdan et al. als Ursache der *GNE*-Myopathie angesehen, weshalb nach zwei Studien an Knock-in-Mäusen auch hier die orale Gabe von Sialinsäure als mögliche therapeutische Option am Menschen gesehen wird, da sich die Muskelatrophie und –schwäche bei den Mäusen deutlich besserten (Malicdan, Noguchi et al. 2009; Malicdan, Noguchi et al. 2012). Der unterschiedliche Gehalt von natürlicher Sialinsäure in der täglichen Nahrung der Patienten wird auch als Grund dafür verstanden, dass die *GNE*-Myopathie einen relativ heterogenen Erkrankungsanfang nimmt (Khademian, Mehravar et al. 2012). Der Konsum von sialinsäurereichen Lebensmitteln (wie z. B. insbesondere Molke und Frischmilch) könnte daher zu einer Verzögerung des Krankheitsbeginns und zu einer Linderung der Symptome führen (Malicdan, Noguchi et al. 2010). Wichtig zu betonen ist dabei, dass sich vor allem eine Sialinsäuregabe vor Beginn der Muskelproblematik als sinnvoll erwiesen hat, was wiederum einer frühen genetischen Diagnostik bedarf, sodass vor allem durch Familiendiagnostik asymptotisch Betroffene erkannt und einer frühen Therapie zugeführt werden können.

An anderen neuromuskulären Erkrankungen, allen voran der Duchenne-Muskeldystrophie, sieht man, wie wichtig die genaue Kenntnis der einzelnen Mutationen und deren Lokalisation in Hinblick auf die Entwicklung einer suffizienten Therapie ist. Insgesamt konnten bei dieser Erkrankung bislang 4700 verschiedene Mutationen detektiert werden, wobei vor allem die Deletionen mit 72%iger Häufigkeit von besonderem Interesse sind (Aartsma-Rus, Fokkema et al. 2009). Hier setzt mit großem Erfolg das exon-skipping mit Hilfe sog. Antisense-Oligonukleotide (AON) an, die zu einer Korrektur des Leserasters und damit zu einer Bildung eines kürzeren, aber funktionsfähigen Dystrophin-Proteins führen. Die betroffenen Kinder können somit zwar nicht geheilt werden, aber die Hoffnung besteht, dass ihr Leiden gemildert wird, indem ihre schwere Duchenne-Erkrankung in eine leichtere Form, die Becker-Dystrophie, überführt werden könnte. Die Entwicklung dieser erfolgsversprechenden Gentherapie war nur aufgrund vorausgehender molekulargenetischer Diagnostik möglich, was die Wichtigkeit dieser Strategie auch bei *GNE*-Myopathie-Patienten unterstreicht.

5.2.2 Proteinexpression und subzelluläre Lokalisation von GNE in der Zelle

Bei der Proteinexpression des *GNE*-Gens, die mit Hilfe von Western-Blot-Experimenten überprüft wurde, zeigten sich in Vorarbeiten bei den HeLa-Zellen, die mit pLXSN-Vektor-Konstrukten transient transfiziert wurden, zum Teil zytopathische Effekte, weshalb eine Umklonierung in die Vektoren pCMV-myc und pCMV-HA vorgenommen wurde. Für diese weiteren Experimente wurden nicht nur Zellen der Zelllinie HeLa, sondern auch C2C12-Zellen verwendet, um eine weitere Vergleichsmöglichkeit der Expression in myogenen Zellen zu erhalten.

Dabei war zu allen Zeitpunkten im Western-Blot bei den *GNE*-Wildtyp-Konstrukten, die in den pCMV-HA-Vektor umkloniert wurden, ein unspezifisches Hintergrundsignal detektierbar. Dieses Konstrukt ist also für die Zellkultur eher ungeeignet, wohingegen sich mit demselben Vektor in C2C12-Zellen ein sehr spezifisches Signal erzielen ließ.

Sowohl in HeLa- als auch in C2C12-Zellen zeigte sich in der konfokalen Immunfluoreszenzmikroskopie eine zytoplasmatische als auch in geringerem Umfang eine nukleäre Lokalisation der myc-*GNE* Wildtyp-Konstrukte, die in ähnlicher Weise für das endogene *GNE* vorbeschrieben war (Krause et al., 2005). Die pCMV-Konstrukte sind somit gut geeignet für nachfolgende Studien in Zellkulturmodellen, da sich im Gegensatz zu den Vorversuchen mit pLXSN-Vektorkonstrukten keine abnorme Akkumulation des rekombinanten *GNE* in den Zellen zeigte.

5.3 Rolle des Kandidatengens *HDAC6* bei der Entstehung neurodegenerativer Erkrankungen

5.3.1 Assoziation von *HDAC6* mit *VCP* beim Proteinabbau

HDAC6 ist eine einzigartige, zytoplasmatisch lokalisierte Acetylase, die aufgrund ihrer multiplen Bindungsstellen fähig ist, viele Interaktionen mit fehlgefalteten Proteinen einzugehen und damit die Akkumulation von cyto- oder neurotoxischen Aggregaten verhindert. Da *HDAC6* auch an den p97/*VCP*-Komplex binden kann und dieser eine gewisse regulative Rolle auf den Aggresomenabbau ausübt, postulierten Boyault et al. 2006, dass Mutationen im *HDAC6*-Gen die Akkumulation von Einschlusskörper-Formationen auslösen kann (Boyault, Gilquin et al. 2006).

Basierend auf dieser Grundlage stellten wir die Hypothese auf, dass Veränderungen der Basensequenz im *HDAC6*-Gen möglicherweise auch einen Teil von bisher

molekulargenetisch noch nicht charakterisierten Einschlusskörpermyopathien verursachen könnte, die phänotypisch bislang u. a. einer mono- oder oligosymptomatischen IBMPFD ähnelten ohne Nachweis einer entsprechenden Veränderung im *VCP*-Gen.

5.3.2 Phänotypischer Vergleich der Patientenkollektive

Um eine mögliche Mutation im *HDAC6*-Gen nachzuweisen, wurde das Patientenkollektiv mit größtmöglicher phänotypischer Übereinstimmung mit IBMPFD-Patienten ausgewählt. Da die klinische Präsentation von Patienten mit einer *VCP*-Mutation relativ heterogen ist, wurden sowohl Patienten mit proximaler als auch distaler Muskelschwäche eingeschlossen sowie gehfähige als auch immobile Erkrankte. Der Beginn der Muskelschwäche bei einer IBMPFD liegt laut Kimonis und Watts bei 45 Jahren, sodass auch das Alter bei Symptombeginn unseres Patientenkollektiv mit 51,5 Jahren annähernd übereinstimmt (Kimonis and Watts 2005). Im EMG zeigte sich sowohl bei IBMPFD-Patienten als auch bei unserem Kollektiv ein myopathisches Muster mit kleinen, schmalen polyphasischen Aktionspotenzialen, Fibrillationen und poly-sharp-wave-Komplexen. Die Muskelbiopsien waren in ihren Pathologien sehr variabel. Bei 12 der biopsierten Patienten fand sich eine Einschlusskörpermyopathie bzw. Einschlusskörpermyositis mit dem Nachweis von rimmed vacuoles in der lichtmikroskopischen Analyse. Bei 6 davon konnten auch auf elektronenmikroskopischer Ebene tubulofilamentöse Einschlüsse nachgewiesen werden. 13 Patienten wurden nach den klinischen Kriterien einer Schultergürtelmuskeldystrophie ausgewählt, da sich die *VCP*-assoziierte Myopathie im frühen Verlauf auch mit einer Schwäche der Schultergürtelmuskulatur manifestieren kann.

5.3.3 Bedeutung der Polymorphismen

Bei den 23 molekulargenetisch untersuchten Patienten wurden zwei Polymorphismen gefunden, die sich in einer nicht-kodierenden intronischen Sequenz des Gens befanden und mit nur sehr geringer Wahrscheinlichkeit die Translation in das Proteinprodukt stören. Das Auftreten des Polymorphismus vor dem vierten Exon ist zwar bekannt, die Häufigkeit in Kontrollpopulationen wird jedoch nicht angegeben

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP>, 2014). In unserer Analyse konnte bei jedem der Untersuchten, ob klinisch erkrankt oder gesund, diese singuläre Nukleotiddeletion festgestellt werden, sodass wir von einer eher häufigen, nicht-pathogenen Manifestation in der Bevölkerung ausgehen.

Um eine Aussage hinsichtlich der Pathogenität der zweiten, bislang noch nicht beschriebenen Sequenzvariante IVS19-72delAA treffen zu können, wurde mit Hilfe von MutationTaster (<http://www.mutationtaster.org>, 2014) eine datenbankgestützte Pathogenitätsprognose errechnet (Schwarz, Rodelsperger et al. 2010). Der MutationTaster integriert Informationen aus verschiedenen Datenbanken und nutzt etablierte Analyse-Tools. So beinhaltet die Analyse phylogenetisch konservierte Stellen, Spleißstellenveränderungen, Verlust von Proteineigenschaften und Sequenzveränderungen, die möglicherweise Leserasterverschiebungen und Strangabbrüche verursachen. Auf der Basis dieser Daten wurde anschließend eine Aussage darüber getroffen, ob die zu untersuchende Sequenzvariante Pathogenitätspotential aufweist. Bei der Analyse ergab sich für die Veränderung IVS19-72delAA die Vorhersage „Polymorphismus“ mit einem Wahrscheinlichkeitswert $p=0,7106$, wobei ein p -Wert nahe 1 einen Indikator für eine hohe Vorhersagesicherheit darstellt. Eine Häufigkeit ist leider bisher noch nicht beschrieben worden. Da aber auch hier bei allen untersuchten DNA-Proben ($n= 28$) diese Veränderung festgestellt werden konnte, wird eine eher häufige Frequenz vermutet.

5.3.4 Interpretation der *HDAC6*-Genanalysen

In der vorliegenden Arbeit konnte die Hypothese, dass Mutationen im *HDAC6*-Gen an der Entstehung von Einschlusskörpermyopathien im ausgewählten Patientenkollektiv beteiligt sind, nicht bestätigt werden. Einzig heterozygote, nicht-pathogene Varianten konnten identifiziert werden.

Es ist möglich, dass unsere untersuchte Kohorte mit 23 Personen zu klein war, um sehr selten auftretende, möglicherweise pathogene Genvarianten bei Einschlusskörpermyopathien oder –myositiden zu entdecken. Auch bei anderen Genen, die ursächlich bei hereditären Einschlusskörpermyopathien beschrieben sind, ist die Frequenz von pathogenen Mutationen sehr gering. So wurde weltweit bislang nur von 38 Familien berichtet, die an einer IBMPFD leiden (Gonzalez-Perez, Cirulli et al. 2012). Sollte eine Mutation im *HDAC6*-Gen an der Entstehung einer ähnlich seltenen

Erkrankung beteiligt sein, wäre die Größe der untersuchten Patientengruppe möglicherweise nicht ausreichend genug.

Wie die mannigfaltige, heterogene klinische Präsentation von Personen mit einer GNE-Myopathie bzw. IBMPFD zeigt, könnte diese Tatsache dazu geführt haben, dass die geeignete Patientenpopulation unterrepräsentiert war. Bei der Auswahl wurde auf eine gleichmäßige Verteilung zwischen männlichem und weiblichen Geschlecht geachtet, da bei einer IBMPFD Männer und Frauen gleich häufig betroffen sind und wegen des bekannten Erkrankungsbeginns zwischen der 3. und 4. Lebensdekade eine eher mittlere Altersgruppe (Durchschnitt 51,5 Jahre) eingeschlossen wurde (Kimonis, Mehta et al. 2008). Da die Muskelschwäche bei Patienten mit einer IBMPFD mit 90% das führende und häufigste Symptom ist, wurden auch in die vorliegende Untersuchung Patienten mit diesem Leitsymptom eingeschlossen. So wurde versucht, eine größtmögliche Kongruenz zwischen dem bekannten Phänotyp einer IBMPFD und dem Untersuchungskollektiv herzustellen.

Da HDAC6 mehrere Rollen in der Proteindegradation übernimmt, wäre auch eine Beteiligung an anderen, neurodegenerativen Krankheiten möglich, die nicht unbedingt mit einer Myopathie einhergehen. Auch bei Mutationen im *VCP*-Gen konnte gezeigt werden, dass sie nicht nur ursächlich für eine IBMPFD sind, sondern auch zu anderen neurodegenerativen Krankheiten führen. Die Exom-Sequenzierung des *VCP*-Gens hat so gezeigt, dass Mutationen in diesem Gen auch eine seltene Ursache von familiärer Amyotropher Lateralsklerose (ALS) darstellen können (Johnson, Mandrioli et al. 2010) und an ca. 1-2% der hereditären Fälle beteiligt sind. Ein verbindendes Symptom dieser beiden Erkrankungen, ALS und IBMPFD, kann eine frontotemporale Demenz sein, die bei beiden auftreten kann. Clemen et al. konnten 2010 zum ersten Mal zeigen, dass eine Interaktion zwischen den Proteinen VCP und Strumpellin besteht, das an der Entstehung von hereditärer spastischer Hemiplegie beteiligt ist (Clemen, Tangavelou et al. 2010). Basierend auf dieser Feststellung, wurde 2012 ein Brüderpaar detektiert, das an einer *VCP*-Mutation leidet (p.Arg159Cys) und den klinischen Phänotyp einer hereditären spastischen Hemiplegie aufweist (de Bot, Schelhaas et al. 2012). Aufgrund der Assoziation von *VCP*-Mutationen mit einem breiten Spektrum neurodegenerativer Erkrankungen wäre es denkbar, dass auch *HDAC6*-Genvarianten zu anderen Erkrankungen führen können.

Eine weitere Überlegung, warum in unserem Patientenkollektiv keine krankheitsassoziierte *HDAC6*-Variante gefunden werden konnte, ist, dass eine solche

Veränderung der Gensequenz eine so schwerwiegende Erkrankung nach sich ziehen würde, die mit dem Leben nicht vereinbar ist. Homozygote *HDAC6*-Knock-out Mäuse hingegen sind lebens- und fortpflanzungsfähig, weisen aber eine globale Hyperacetylierung von Tubulin auf. Sie zeigen ein geringgradig beeinträchtigt Immunsystem und eine leichte Erhöhung der Dichte des Trabekelwerks der Spongiosa (<http://www.informatics.jax.org/marker/MGI:1333752>, 2014). Interessanterweise führen ja auch Veränderungen im *VCP*-Gen zu einem ossären Phänotyp im Sinne eines M. Paget. Auch bei Mutationen im *GNE*-Gen scheinen die Mausmodelle, wie oben dargestellt, nicht immer exakt auf den Menschen übertragbar zu sein, sodass auch bei *HDAC6*-Genvarianten Abweichungen im Tiermodell denkbar wären.

Auch wenn die in der vorliegenden Arbeit angewendete Methode der PCR-Analyse von Genen ein etabliertes Verfahren in der molekulargenetischen Analyse darstellt, liegt die Sensitivität der direkten Sequenzierung bei circa 95%. Es bleibt zu beachten, dass der fehlende Nachweis von krankheitsassoziierten Mutationen nicht als absolut sicherer Ausschluss von Veränderungen der Gensequenz verstanden werden darf, da sich die Analyse hauptsächlich auf die kodierenden Bereiche des *HDAC6*-Gens und flankierende intronische Sequenzen beschränkt. Es können somit beispielsweise keine großen Deletionen oder Insertionen detektiert werden und nicht sämtliche regulatorisch wirkenden Genvarianten berücksichtigt werden, welche sich auf die Gen-Expression auswirken könnten.

Zusammenfassend werden künftig neue Technologien wie die Gesamtexom-Analyse die aufwändige Kandidatengensequenzierung ablösen, um bei neuromuskulären Erkrankungen Mutationen in neuen oder bekannten Genen zu identifizieren, die wesentliche Erkenntnisse zur Genotyp-Phänotyp-Korrelation und mögliche kausale Ansatzpunkte für personalisierte Therapiestrategien liefern werden.

6 LITERATURVERZEICHNIS

- Aartsma-Rus, A., I. Fokkema, et al. (2009). "Theoretic applicability of antisense-mediated exon skipping for Duchenne muscular dystrophy mutations." Hum Mutat **30**(3): 293-299.
- Alders, M., R. Jongbloed, et al. (2003). "The 2373insG mutation in the MYBPC3 gene is a founder mutation, which accounts for nearly one-fourth of the HCM cases in the Netherlands." Eur Heart J **24**(20): 1848-1853.
- Amsili, S., Z. Shlomai, et al. (2007). "Characterization of hereditary inclusion body myopathy myoblasts: possible primary impairment of apoptotic events." Cell Death Differ **14**(11): 1916-1924.
- Andersen, P. S., O. Havndrup, et al. (2004). "Genetic and phenotypic characterization of mutations in myosin-binding protein C (MYBPC3) in 81 families with familial hypertrophic cardiomyopathy: total or partial haploinsufficiency." Eur J Hum Genet **12**(8): 673-677.
- Arai, A., K. Tanaka, et al. (2002). "A novel mutation in the GNE gene and a linkage disequilibrium in Japanese pedigrees." Ann Neurol **52**(4): 516-519.
- Argov, Z. and R. Yarom (1984). "'Rimmed vacuole myopathy' sparing the quadriceps. A unique disorder in Iranian Jews." J Neurol Sci **64**(1): 33-43.
- Askanas, V. and W. K. Engel (2006). "Inclusion-body myositis: a myodegenerative conformational disorder associated with Abeta, protein misfolding, and proteasome inhibition." Neurology **66**(2 Suppl 1): S39-48.
- Boyault, C., B. Gilquin, et al. (2006). "HDAC6-p97/VCP controlled polyubiquitin chain turnover." EMBO J **25**(14): 3357-3366.
- Carrier, L., G. Bonne, et al. (1997). "Organization and sequence of human cardiac myosin binding protein C gene (MYBPC3) and identification of mutations predicted to produce truncated proteins in familial hypertrophic cardiomyopathy." Circ Res **80**(3): 427-434.
- Carrier, L., S. Schlossarek, et al. (2010). "The ubiquitin-proteasome system and nonsense-mediated mRNA decay in hypertrophic cardiomyopathy." Cardiovasc Res **85**(2): 330-338.
- Chai, Y., T. E. Bertorini, et al. (2011). "Hereditary inclusion-body myopathy associated with cardiomyopathy: report of two siblings." Muscle Nerve **43**(1): 133-136.
- Clemen, C. S., K. Tangavelou, et al. (2010). "Strumpellin is a novel valosin-containing protein binding partner linking hereditary spastic paraplegia to protein aggregation diseases." Brain **133**(10): 2920-2941.

- Daehmlow, S., J. Erdmann, et al. (2002). "Novel mutations in sarcomeric protein genes in dilated cardiomyopathy." Biochem Biophys Res Commun **298**(1): 116-120.
- Dalakas, M. C. (2002). "Muscle biopsy findings in inflammatory myopathies." Rheum Dis Clin North Am **28**(4): 779-798, vi.
- Darvish, D., P. Vahedifar, et al. (2002). "Four novel mutations associated with autosomal recessive inclusion body myopathy (MIM: 600737)." Mol Genet Metab **77**(3): 252-256.
- de Bot, S. T., H. J. Schelhaas, et al. (2012). "Hereditary spastic paraplegia caused by a mutation in the VCP gene." Brain **135**(Pt 12): e223.
- DeLaBarre, B., J. C. Christianson, et al. (2006). "Central pore residues mediate the p97/VCP activity required for ERAD." Mol Cell **22**(4): 451-462.
- Eisenberg, I., N. Avidan, et al. (2001). "The UDP-N-acetylglucosamine 2-epimerase/N-acetylmannosamine kinase gene is mutated in recessive hereditary inclusion body myopathy." Nat Genet **29**(1): 83-87.
- Eisenberg, I., G. Grabov-Nardini, et al. (2003). "Mutations spectrum of GNE in hereditary inclusion body myopathy sparing the quadriceps." Hum Mutat **21**(1): 99.
- Eisenberg, I., N. Novershtern, et al. (2008). "Mitochondrial processes are impaired in hereditary inclusion body myopathy." Hum Mol Genet **17**(23): 3663-3674.
- Erdmann, J., S. Daehmlow, et al. (2003). "Mutation spectrum in a large cohort of unrelated consecutive patients with hypertrophic cardiomyopathy." Clin Genet **64**(4): 339-349.
- Galeano, B., R. Klootwijk, et al. (2007). "Mutation in the key enzyme of sialic acid biosynthesis causes severe glomerular proteinuria and is rescued by N-acetylmannosamine." J Clin Invest **117**(6): 1585-1594.
- Garcia-Mata, R., Y. S. Gao, et al. (2002). "Hassles with taking out the garbage: aggravating aggresomes." Traffic **3**(6): 388-396.
- Gautel, M., D. O. Furst, et al. (1998). "Isoform transitions of the myosin binding protein C family in developing human and mouse muscles: lack of isoform transcomplementation in cardiac muscle." Circ Res **82**(1): 124-129.
- Gautel, M., O. Zuffardi, et al. (1995). "Phosphorylation switches specific for the cardiac isoform of myosin binding protein-C: a modulator of cardiac contraction?" EMBO J **14**(9): 1952-1960.
- Girolami, F., C. Y. Ho, et al. (2010). "Clinical features and outcome of hypertrophic cardiomyopathy associated with triple sarcomere protein gene mutations." J Am Coll Cardiol **55**(14): 1444-1453.

- Gonzalez-Perez, P., E. T. Cirulli, et al. (2012). "Novel mutation in VCP gene causes atypical amyotrophic lateral sclerosis." Neurology **79**(22): 2201-2208.
- Greenman, C., P. Stephens, et al. (2007). "Patterns of somatic mutation in human cancer genomes." Nature **446**(7132): 153-158.
- Grozinger, C. M., C. A. Hassig, et al. (1999). "Three proteins define a class of human histone deacetylases related to yeast Hda1p." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(9): 4868-4873.
- Halawani, D. and M. Latterich (2006). "p97: The cell's molecular purgatory?" Mol Cell **22**(6): 713-717.
- Harris, S. P., C. R. Bartley, et al. (2002). "Hypertrophic cardiomyopathy in cardiac myosin binding protein-C knockout mice." Circ Res **90**(5): 594-601.
- Hayashi, T., T. Arimura, et al. (2004). "Tcap gene mutations in hypertrophic cardiomyopathy and dilated cardiomyopathy." J Am Coll Cardiol **44**(11): 2192-2201.
- Hubbers, C. U., C. S. Clemen, et al. (2007). "Pathological consequences of VCP mutations on human striated muscle." Brain **130**(Pt 2): 381-393.
- Hung, T., K. Mak, et al. (1990). "A specificity enhancer for polymerase chain reaction." Nucleic Acids Res **18**(16): 4953.
- Jaaskelainen, P., J. Kuusisto, et al. (2002). "Mutations in the cardiac myosin-binding protein C gene are the predominant cause of familial hypertrophic cardiomyopathy in eastern Finland." J Mol Med (Berl) **80**(7): 412-422.
- Johnson, J. O., J. Mandrioli, et al. (2010). "Exome sequencing reveals VCP mutations as a cause of familial ALS." Neuron **68**(5): 857-864.
- Ju, J. S. and C. C. Wehl (2010). "Inclusion body myopathy, Paget's disease of the bone and fronto-temporal dementia: a disorder of autophagy." Hum Mol Genet **19**(R1): R38-45.
- Kaback, M., J. Lopatequi, et al. (2010). "Genetic screening in the Persian Jewish community: A pilot study." Genet Med **12**(10): 628-633.
- Kaffman, A. and E. K. O'Shea (1999). "Regulation of nuclear localization: a key to a door." Annu Rev Cell Dev Biol **15**: 291-339.
- Kawaguchi, Y., J. J. Kovacs, et al. (2003). "The deacetylase HDAC6 regulates aggresome formation and cell viability in response to misfolded protein stress." Cell **115**(6): 727-738.
- Khademian, H., E. Mehravar, et al. (2012). "Prevalence of GNE p.M712T and Hereditary Inclusion Body Myopathy (HIBM) in Sangesar Population of Northern Iran." Clin Genet.

- Kimonis, V. E., E. Fulchiero, et al. (2008). "VCP disease associated with myopathy, Paget disease of bone and frontotemporal dementia: review of a unique disorder." Biochim Biophys Acta **1782**(12): 744-748.
- Kimonis, V. E., S. G. Mehta, et al. (2008). "Clinical studies in familial VCP myopathy associated with Paget disease of bone and frontotemporal dementia." Am J Med Genet A **146A**(6): 745-757.
- Kimonis, V. E. and G. D. Watts (2005). "Autosomal dominant inclusion body myopathy, Paget disease of bone, and frontotemporal dementia." Alzheimer Dis Assoc Disord **19 Suppl 1**: S44-47.
- Koboldt, D. C., K. Chen, et al. (2009). "VarScan: variant detection in massively parallel sequencing of individual and pooled samples." Bioinformatics **25**(17): 2283-2285.
- Krause, S., S. Hinderlich, et al. (2005). "Localization of UDP-GlcNAc 2-epimerase/ManAc kinase (GNE) in the Golgi complex and the nucleus of mammalian cells." Exp Cell Res **304**(2): 365-379.
- Krause, S., B. Schlotter-Weigel, et al. (2003). "A novel homozygous missense mutation in the GNE gene of a patient with quadriceps-sparing hereditary inclusion body myopathy associated with muscle inflammation." Neuromuscul Disord **13**(10): 830-834.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." Nature **227**(5259): 680-685.
- Lee, J. Y., H. Koga, et al. (2010). "HDAC6 controls autophagosome maturation essential for ubiquitin-selective quality-control autophagy." EMBO J **29**(5): 969-980.
- Li, G., H. Jiang, et al. (2011). "HDAC6 alpha-tubulin deacetylase: a potential therapeutic target in neurodegenerative diseases." J Neurol Sci **304**(1-2): 1-8.
- Li, H. and R. Durbin (2009). "Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform." Bioinformatics **25**(14): 1754-1760.
- Li, H. and R. Durbin (2010). "Fast and accurate long-read alignment with Burrows-Wheeler transform." Bioinformatics **26**(5): 589-595.
- Luther, P. K., P. M. Bennett, et al. (2008). "Understanding the organisation and role of myosin binding protein C in normal striated muscle by comparison with MyBP-C knockout cardiac muscle." J Mol Biol **384**(1): 60-72.
- Malicdan, M. C., S. Noguchi, et al. (2009). "Prophylactic treatment with sialic acid metabolites precludes the development of the myopathic phenotype in the DMRV-hIBM mouse model." Nat Med **15**(6): 690-695.

- Malicdan, M. C., S. Noguchi, et al. (2010). "A preclinical trial of sialic acid metabolites on distal myopathy with rimmed vacuoles/hereditary inclusion body myopathy, a sugar-deficient myopathy: a review." *Ther Adv Neurol Disord* **3**(2): 127-135.
- Malicdan, M. C., S. Noguchi, et al. (2012). "Peracetylated N-acetylmannosamine, a synthetic sugar molecule, efficiently rescues muscle phenotype and biochemical defects in mouse model of sialic acid-deficient myopathy." *J Biol Chem* **287**(4): 2689-2705.
- Maron, B. J., J. M. Gardin, et al. (1995). "Prevalence of hypertrophic cardiomyopathy in a general population of young adults. Echocardiographic analysis of 4111 subjects in the CARDIA Study. Coronary Artery Risk Development in (Young) Adults." *Circulation* **92**(4): 785-789.
- Michels, M., Y. M. Hoedemaekers, et al. (2007). "Familial screening and genetic counselling in hypertrophic cardiomyopathy: the Rotterdam experience." *Neth Heart J* **15**(5): 184-190.
- Morita, H., H. L. Rehm, et al. (2008). "Shared genetic causes of cardiac hypertrophy in children and adults." *N Engl J Med* **358**(18): 1899-1908.
- Moroianu, J. (1998). "Distinct nuclear import and export pathways mediated by members of the karyopherin beta family." *J Cell Biochem* **70**(2): 231-239.
- Mullis, K. B. (1990). "The unusual origin of the polymerase chain reaction." *Sci Am* **262**(4): 56-61, 64-55.
- Nanni, L., M. Pieroni, et al. (2003). "Hypertrophic cardiomyopathy: two homozygous cases with "typical" hypertrophic cardiomyopathy and three new mutations in cases with progression to dilated cardiomyopathy." *Biochem Biophys Res Commun* **309**(2): 391-398.
- Neumann, M., I. R. Mackenzie, et al. (2007). "TDP-43 in the ubiquitin pathology of frontotemporal dementia with VCP gene mutations." *J Neuropathol Exp Neurol* **66**(2): 152-157.
- Niimura, H., L. L. Bachinski, et al. (1998). "Mutations in the gene for cardiac myosin-binding protein C and late-onset familial hypertrophic cardiomyopathy." *N Engl J Med* **338**(18): 1248-1257.
- Nishino, I., M. C. Malicdan, et al. (2005). "Molecular pathomechanism of distal myopathy with rimmed vacuoles." *Acta Myol* **24**(2): 80-83.
- Nonaka, I., N. Sunohara, et al. (1981). "Familial distal myopathy with rimmed vacuole and lamellar (myeloid) body formation." *J Neurol Sci* **51**(1): 141-155.
- Oakley, C. E., B. D. Hambly, et al. (2004). "Myosin binding protein C: structural abnormalities in familial hypertrophic cardiomyopathy." *Cell Res* **14**(2): 95-110.

- Olivotto, I., F. Girolami, et al. (2008). "Myofilament protein gene mutation screening and outcome of patients with hypertrophic cardiomyopathy." Mayo Clin Proc **83**(6): 630-638.
- Pandey, U. B., Z. Nie, et al. (2007). "HDAC6 rescues neurodegeneration and provides an essential link between autophagy and the UPS." Nature **447**(7146): 859-863.
- Richard, P., P. Charron, et al. (2003). "Hypertrophic cardiomyopathy: distribution of disease genes, spectrum of mutations, and implications for a molecular diagnosis strategy." Circulation **107**(17): 2227-2232.
- Richardson, P., W. McKenna, et al. (1996). "Report of the 1995 World Health Organization/International Society and Federation of Cardiology Task Force on the Definition and Classification of cardiomyopathies." Circulation **93**(5): 841-842.
- Robinson, J. T., H. Thorvaldsdottir, et al. (2011). "Integrative genomics viewer." Nat Biotechnol **29**(1): 24-26.
- Sadeh, M., N. Gadoth, et al. (1993). "Vacuolar myopathy sparing the quadriceps." Brain **116 (Pt 1)**: 217-232.
- Sahai, I., H. Baris, et al. (2005). "Krabbe disease: severe neonatal presentation with a family history of multiple sclerosis." J Child Neurol **20**(10): 826-828.
- Schlossarek, S., G. Mearini, et al. (2011). "Cardiac myosin-binding protein C in hypertrophic cardiomyopathy: mechanisms and therapeutic opportunities." J Mol Cell Cardiol **50**(4): 613-620.
- Schwarz, J. M., C. Rodelsperger, et al. (2010). "MutationTaster evaluates disease-causing potential of sequence alterations." Nat Methods **7**(8): 575-576.
- Sivakumar, K. and M. C. Dalakas (1996). "The spectrum of familial inclusion body myopathies in 13 families and a description of a quadriceps-sparing phenotype in non-Iranian Jews." Neurology **47**(4): 977-984.
- Squire, J. M., P. K. Luther, et al. (2003). "Structural evidence for the interaction of C-protein (MyBP-C) with actin and sequence identification of a possible actin-binding domain." J Mol Biol **331**(3): 713-724.
- Starr, R. and G. Offer (1971). "Polypeptide chains of intermediate molecular weight in myosin preparations." FEBS Lett **15**(1): 40-44.
- Tajsharghi, H., T. P. Leren, et al. (2010). "Unexpected myopathy associated with a mutation in MYBPC3 and misplacement of the cardiac myosin binding protein C." J Med Genet **47**(8): 575-577.
- Van Driest, S. L., V. C. Vasile, et al. (2004). "Myosin binding protein C mutations and compound heterozygosity in hypertrophic cardiomyopathy." J Am Coll Cardiol **44**(9): 1903-1910.

- Wang, H., L. Song, et al. (2009). "[A novel hot-spot mutation S236G in the cardiac myosin binding protein C gene in Chinese patient with hypertrophic cardiomyopathy]." Zhonghua Xin Xue Guan Bing Za Zhi **37**(12): 1078-1080.
- Wang, Z., Z. Sun, et al. (2006). "Roles for UDP-GlcNAc 2-epimerase/ManNAc 6-kinase outside of sialic acid biosynthesis: modulation of sialyltransferase and BiP expression, GM3 and GD3 biosynthesis, proliferation, and apoptosis, and ERK1/2 phosphorylation." J Biol Chem **281**(37): 27016-27028.
- Watts, G. D., D. Thomasova, et al. (2007). "Novel VCP mutations in inclusion body myopathy associated with Paget disease of bone and frontotemporal dementia." Clin Genet **72**(5): 420-426.
- Watts, G. D., J. Wymer, et al. (2004). "Inclusion body myopathy associated with Paget disease of bone and frontotemporal dementia is caused by mutant valosin-containing protein." Nat Genet **36**(4): 377-381.
- Weber, F. E., K. T. Vaughan, et al. (1993). "Complete sequence of human fast-type and slow-type muscle myosin-binding-protein C (MyBP-C). Differential expression, conserved domain structure and chromosome assignment." Eur J Biochem **216**(2): 661-669.
- Weihl, C. C., A. Pestronk, et al. (2009). "Valosin-containing protein disease: inclusion body myopathy with Paget's disease of the bone and fronto-temporal dementia." Neuromuscul Disord **19**(5): 308-315.
- Yamamoto, K. and C. Moos (1983). "The C-proteins of rabbit red, white, and cardiac muscles." J Biol Chem **258**(13): 8395-8401.
- Yang, X. J. and S. Gregoire (2005). "Class II histone deacetylases: from sequence to function, regulation, and clinical implication." Mol Cell Biol **25**(8): 2873-2884.
- Yasuda, M., S. Koshida, et al. (1995). "Complete primary structure of chicken cardiac C-protein (MyBP-C) and its expression in developing striated muscles." J Mol Cell Cardiol **27**(10): 2275-2286.
- Yunis, E. J. and F. J. Samaha (1971). "Inclusion body myositis." Lab Invest **25**(3): 240-248.
- Zucman-Rossi, J., S. Benhamouche, et al. (2007). "Differential effects of inactivated Axin1 and activated beta-catenin mutations in human hepatocellular carcinomas." Oncogene **26**(5): 774-780.

7 ANHANG

7.1 Abkürzungsverzeichnis

AAA ⁺	ATPase associated with various activities
ALS	amyotrophe Lateralsklerose
ant.	Anterior
AP	Angina pectoris
APS	Ammoniumpersulfat
ASD	Atriumseptumdefekt
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	bicinchoninic acid
bp	Basenpaar
CK	Kreatinkinase
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMRV	distal myopathy with rimmed vacuoles
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonucleic acid
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
ECL	enhanced chemoluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
eGFP	enhanced green fluorescent protein
EMG	Elektromyogramm
ERAD	endoplasmic reticulum associated degradation
EtBr	Ethidiumbromid
FBS	fötales Kälberserum (<u>f</u> etal <u>b</u> ovine <u>s</u> erum)
FSHD	fazioscapulohumerale Dystrophie
HA	Haemagglutinin
HCM	hypertrophe Kardiomyopathie
hIBM	hereditary inclusion body myopathy
HOCM	Hypertrophe obstruktive Kardiomyopathie
IBM	Einschlusskörpermyositis (<u>i</u> nclusion <u>b</u> ody <u>m</u> yopathy)
ICD	implantierbarer Cardioverter-Defibrillator
Ig	Immunglobulin

kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
LB	lysogeny broth
LGMD	Gliedergürteldystrophie (<u>l</u> imb <u>g</u> irdle <u>m</u> uscular <u>d</u> ystrophy)
LMM	light meromyosin
LVEF	linksventrikuläre Ejektionsfraktion
LVH	linksventrikuläre Hypertrophie
M.	Musculus, Morbus
MER	Muskeleigenreflex
MRC	Medical Research Council
MRT	Magnetresonanztomographie
MTOC	Mikrotubuli Organisationszentrum
MYH7	myosin heavy chain 7
NES	nukleäres Exportsignal
NGS	Next Generation Sequencing
NYHA	New York Heart Association
OMIM	Online Mendelian Inheritance in Man
PBS	physiologische Salzlösung in Phosphatpuffer (<u>p</u> hosphate <u>b</u> uffered <u>s</u> aline)
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion (<u>p</u> olymerase <u>c</u> hain <u>r</u> eaction)
PDB	M. Paget (<u>P</u> aget's <u>D</u> isease of Bone)
RNA	ribonucleic acid
Rpm	rounds per minute
SDS	Natriumdodecylsulfat (<u>s</u> odium <u>d</u> odecyl <u>s</u> ulfate)
sIBM	sporadic inclusion body myopathy
TAE	Tris-Acetat-EDTA
taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBS-T	tris-buffered saline and tween 20
TDP43	TAR-DNA-binding protein 43
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylethylendiamin
tm	Schmelztemperatur (<u>m</u> elting <u>t</u> emperature)
TNNT2	troponin T type 2
UPS	Ubiquitin Proteasom System
WT	Wildtyp

7.2 Primer-Sequenzen

7.2.1 GNE

	PCR product (bp)	sense primer 5' - 3'	Tm (°C)		antisense primer 3' - 5'	Tm (°C)	
Exon 2	449	2s	54.0	gtggttaaggactgaaact	2a	56.7	gtgactactctaaggccac
Exon 3	618	3s	56.5	cttcagagttggtgttagattg	3a	56.5	ccaaaaggattgaaatagacgg
Exon 4	335	4s	57.3	gcacagacttagagctctgc	4a	56.7	gagcaagataggaaggcag
Exon 5	357	5s	58.0	gtgggctatactgccaatg	5a	58.0	gcatacctataacaactcacg
Exon 6	269	6s	54.7	ggctcaattatgacatagtac	6a	58.0	ggatgattaaacagtgattgag
Exon 7	396	7s	53.3	ctgaagctcagttccattac	7a	51.7	gtttctagcttaccctccaac
Exon 8	308	8s	64.0	cctatagcagtgctcaattgtc	8a	62.0	gctcaggcatgatcacaaag
Exon 9	424	9s	56.6	cgttgtcttaggagactctgg	9a	64.0	gcagagttgtaaccactctgac
Exon 10	372	10s	60.0	ggctcagtgctcagctgtc	10a	62.0	ggctcagtgctcagctgtc
Exon 11	344	11s	61.2	gtgaaaagaaaacaccgtctcc	11a	58.3	gacactgcaaacacctctgc
Exon 12	461	12s	64.0	ctttaacattctgctgtgctgc	12a	63.0	atttctgcctcaaaagctctgc

7.2.2 VCP

	PCR product (bp)	sense primer 5' - 3'	Tm (°C)		antisense primer 3' - 5'	Tm (°C)	
Exon 1	706	1s	66.0	attggctgtgatctcgggttgc	1a	64.0	tccgttctaagggagccaatcg
Exon 2	441	2s	67.0	gggacagctcatctattcactgttc	2a	68.0	gtcaccctgcgaacaactgcaattcctc
Exon 3	473	3s	60.5	acagtggtgtccttgcaccaggtaa	3a	68.0	ggctctgctgtaatacatgggtcct
Exon 4	360	4s	69.0	tccaccctgttctcctctctcttc	4a	60.4	gataaagatgtccaaggttattccc
Exon 5	324	5s	57.0	agggcactatctaagagcttggc	5a	64.0	gccgagcaccagctcctgacagttac
Exon 6	302	6s	63.0	gtggaatgattagagaaactcagc	6a	62.0	catgcatgaaaacagctcccagg
Exon 7	401	7s	58.0	aagtgcacataaatgttgc	7a	63.0	ataagtctccagctcataagcc
Exon 8	535	8s	71.0	ttctctccagccttgcctggctcgtgc	8a	66.4	aaatgccgtlagagctgggtcaatgc
Exon 9	644	9s	66.6	caacctctgtaaaccttggaggagct	9a	66.6	tcaaacggacctggggacagtacaaa
Exon 10	596	10s	69.0	taatcctctgaagccctcacagtgattg	10a	70.0	ttggacctagaataaggtctcccaac
Exon 11-12	656	11-12s	62.6	cagccttattctaggtcccaagtc	11-12a	69.4	tgagcaaatgtgtgacacctg
Exon 13	782	13s	57.7	atctgatacattgggtacacc	13a	56.5	aataacactaggtctctcagacctc
Exon 14	408	14s	63.0	aattctacctcccttagaccaac	14a	57.0	ggatttctggcctcaagtg
Exon 15	476	15s	73.0	cctcagctcgtacggagtgctcttagtt	15a	73.0	ccaacagcttctacttaactccaggga
Exon 16-17	865	16-17s	63.0	aggagaccaataaactgcagtaatg	16-17a	63.0	agcattgagctcaagtgcagatgc

7.2.3 HDAC6

	PCR product (bp)	sense primer 5' - 3'	Tm (°C)		antisense primer 3' - 5'	Tm (°C)	
Exon 2-3	536	2-3s	65.0	gcgtaaggaatggaatcctaagaggg	2-3a	66.0	gacagttccctctgactcagg
Exon 4	399	4s	62.0	caagcaatggaagaagacctaac	4a	65.0	gaggtagggtcacactgaaag
Exon 5-6	536	5-6s	66.0	agtggtgaggagaggggcaca	5-6a	61.0	gagccttctgaactctgtgt
Exon 7-8	558	7-8s	64.0	gctattctcagggtgacagttg	7-8a	61.0	gggtaatatatcatgtgattcaagaa
Exon 9-10	577	9-10s	60.0	taggcacagcattaagaagattg	9-10a	64.0	gtctgccatctcctaattcact
Exon 11-13	748	11-13s	60.0	tgagagaatgaacgagtggtg	11-13a	66.0	ctgtctgagggtgagtgactc
Exon 14	384	14s	64.0	gtagcctcatggagctgtctcc	14a	63.0	ccttgcataagtcacttcactctt
Exon 15-16	455	15-16s	61.0	ctgtgtctgacatgtgtatg	15-16a	61.0	cagactcctctgacttactggg
Exon 17-18	730	17-18s	65.0	agactctctgactttactgggc	17-18a	66.0	gacagaccctccctcactgtcct
Exon 19	341	19s	63.0	gaagtcctctgtctagggtg	19a	63.0	ctggaggctctgagagagtc
Exon 20	801	20s	58.0	gagaaggggaaggggtgc	20a	63.0	ctctgggaagggactgcacc
Exon 21-22	602	21-22s	64.0	ttctccttaactgataggaccag	21-22a	65.0	gtgtgtgtgactaccatgtgg
Exon 23	378	23s	67.0	ctagtctccagttctgtctcc	23a	62.0	caccatcactcaggacagtttc
Exon 24	500	24s	63.0	tatctaaaggtgtgggtctgttc	24a	65.0	gagaagggaccctccagttctaagt
Exon 25_1	380	25_1s	63.0	caatcactgagaccatccaagtc	25_1a	66.0	gaggctgtgaggaggactacact
Exon 25_2	649	25_2s	64.0	actccaggccagactaactcag	25_2a	69.0	gagaggagaacctactaggagagggc
Exon 26-27	605	26-27s	62.0	aatctcaggtgaaggtccaccacccc	26-27a	66.0	ctcaggctactctgtgtcttcat
Exon 28-29	645	28-29s	63.0	tctctgctacaggtatggagc	28-29a	64.0	ctgtactgtgagagggtgag

7.2.4 MYBPC3

	PCR product (bp)	sense primer 5' - 3'	Tm (°C)		antisense primer 3' - 5'	Tm (°C)	
Exon 1	160	1s	62.0	aggacaggagcccactcag	1a	60.0	gctcccaattgtagacacc
Exon 2	425	2s	58.0	tattactgagaggggctgc	2a	59.0	gtccctggatggatggag
Exon 3	245	3s	63.0	gtggaggggtctctggttag	3a	58.0	cagcaaaagcctttgagacc
Exon 4-5	478	4-5s	58.0	gagccgagattgtgcctc	4-5a	62.0	ctagggtctcctatgtccc
Exon 6	258	6s	59.0	ctccttaaggggtcggag	6a	61.0	aaaaggaggtaggagaccagg
Exon 7-9	613	7-9s	59.0	aggcagggtctcctcaaac	7-9a	57.0	accacagtgctggatttg
Exon 10-11	574	10-11s	60.0	caggtctttgagggaaggtg	10-11a	63.0	ctctcctgttagggaaggg
Exon 12	264	12s	58.0	acagtagcttggcctggg	12a	58.0	aggaggcaaggtatggg
Exon 13-14	512	13-14s	57.0	ctctggatggctgggg	13-14a	61.0	ctcagcctagccgggtg
Exon 15	332	15s	59.0	caaatgtgagttccagaagc	15a	65.0	ctacagggctagggtgggtg
Exon 16	326	16s	57.0	acgccacaccacacac	16a	62.0	gcctctctgcccactgtc
Exon 17-18	376	17-18s	57.0	aagccagggtgtgtg	17-18a	62.0	tctgtgagtgagggggag
Exon 19-20	592	19-20s	62.0	cagtgacctgtctctctc	19-20a	60.0	ggcaccacgtaggtagaaag
Exon 21	329	21s	58.0	gggacatctggctgttg	21a	58.0	gtttgtcgagtggtggaatg
Exon 22-23	542	22-23s	59.0	gcaacgttactcaaggccc	22-23a	60.0	tgcagagcactgctattattg
Exon 24	260	24s	58.0	atccagctccccagg	24a	56.0	tgaatctgctcaatggcaag
Exon 25	301	25s	62.0	agtgaggagtggtgtcag	25a	63.0	cactccactggacaccaag
Exon 26-27	641	26-27s	62.0	ggcctgtctcaaggagg	26-27a	58.0	aaatgtgagctgtgggttg
Exon 28	279	28s	60.0	ccctggagccagtgacc	28a	60.0	agggtagctgcccctg
Exon 29-30	543	29-30s	58.0	gctctggcatcaggaag	29-30a	63.0	ggagaggactgctcaacgtc
Exon 31-32	528	31-32s	62.0	gatgtgtctccctgggtcc	31-32a	58.0	ccactgactgtgcccctg

7.3 Genbank-Zugangsnummern

Gen	genomische Sequenz	mRNA-Sequenz
<i>GNE</i>	AL158830	NM_005476
<i>VCP</i>	AC004472	NM_007126
<i>HDAC6</i>	AF196971	NM_006044
<i>MYBPC3</i>	NC_000011.9	NM_000256

7.4 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abb. 1: Schematische Abbildung des <i>MYBPC3</i> -Gens.....	4
Abb. 2: Schematische Darstellung des dephosphorylierten (A) und phosphorylierten (B) <i>MYBPC3</i> im Sarkomer	5
Abb. 3: Schematische Darstellung der Transfektion.....	23
Abb. 4: Stammbaum der Indexfamilie.....	28
Abb. 5: Ausschnitt aus dem Elektropherogramm der Sequenzanalyse von Exon 6 des <i>MYBPC3</i> -Gens.	31
Abb. 6: Ausschnitt aus dem Elektropherogramm der Sequenzanalyse von Exon 6 des <i>MYBPC3</i> -Gens.....	43
Abb. 7: Darstellung des <i>MYBPC3</i> -Proteins mit den beschriebenen Mutationen.....	44
Abb. 8: Ausschnitt aus dem Elektropherogramm der Sequenzanalyse von Exon 10 des <i>GNE</i> -Gens.....	49
Abb. 9: MRT der Oberschenkel (T1 Wichtung) eines 30jährigen Vergleichspatienten mit nachgewiesener homozygoter <i>GNE</i> -Mutation	50
Abb. 10: Ausschnitt aus dem Elektropherogramm der Sequenzanalyse von Exon 4 des <i>GNE</i> -Gens.....	51
Abb. 11: Ausschnitt aus dem Elektropherogramm der Sequenzanalyse von Exon 10 des <i>GNE</i> -Gens.....	52
Abb. 12: A Western Blot (oben) und Ponceau S-Färbung (unten) transfizierter HeLa-Zellen im pLXSN-Vektor.	53
Abb. 13: A Western Blot und Ponceau S-Färbung transfizierter HeLa-Zellen zu drei verschiedenen Zeitpunkten.....	54
Abb. 14: A Western Blot und Ponceau S-Färbung transfizierter HeLa-Zellen	55
Abb. 15: A Western-Blot (oben) und Ponceau S-Färbung (unten) von transfizierten HeLa-Zellen mit <i>GNE</i> -WT im pCMV-myc-Vektor.....	56
Abb. 16: A Western-Blot (oben) und Ponceau S-Färbung (unten) von C2C12-Zellen im pCMV-myc-Vektor	57
Abb. 17: A Western-Blot (oben) und Ponceau S-Färbung (unten) von HeLa-Zellen transfiziert mit dem HA- <i>GNE</i> WT-Konstrukt.....	57
Abb. 18: A Western-Blot und Ponceau S-Färbung von C2C12-Zellen transfiziert mit dem HA- <i>GNE</i> WT-Konstrukt.....	58

Abb. 19: Konfokale Immunfluoreszenzmikroskopie von C2C12- und HeLa-Zellen nach Transfektion mit dem myc-GNE Wildtyp-Konstrukt und myc-Epitop-Antikörperfärbung	59
Abb. 20: Ausschnitt aus dem Elektropherogramm der Sequenzanalyse vor dem Exon 4 des <i>HDAC6</i> -Gens	62
Abb. 21: Ausschnitt aus dem Elektropherogramm der Sequenzanalyse vor Exon 20 des <i>HDAC6</i> -Gens	63
Tab. 1: Übersicht über die Gliedergürteldystrophien	2
Tab. 2: Zusammensetzung eines Reaktionsansatzes für eine PCR	17
Tab. 3: PCR-Programm am Beispiel des <i>HDAC6</i> -Gens	17
Tab. 4: Pipettierschema eines typischen 1:2-Ligationsansatzes	22
Tab. 5: Pipettierschema der Minigele für die SDS-PAGE	26
Tab. 6: Analyse-Algorithmus der Daten des Next-Generation Sequencing der Indexfamilie zur Identifikation homozygoter SNPs in Kandidatengenen für eine rezessive hereditäre Skelettmuskelerkrankung.	33
Tab. 7: Auf Polymorphismen überprüfte Kandidatengene bei der Schwester des Indexpatienten	34
Tab. 8: Übersicht über die untersuchten Gene, die an der Entstehung einer hypertrophen Kardiomyopathie (HCM) beteiligt sein können	35
Tab. 9: SNPs in den Kandidatengenen Tabelle 7 und 8	37
Tab. 10: Übersicht der im Muskel exprimierten Gene mit heterozygoten Sequenzvarianten bei der Schwester des Indexpatienten	39
Tab. 11: Klinische Charakteristika der 59 neuromuskulären Patienten mit dem Phänotyp einer Gliedergürteldystrophie ohne molekulargenetischen Nachweis einer pathogenen Veränderung in bekannten ursächlichen Genen für Gliedergürteldystrophien.	42
Tab. 12: Übersicht über die Mutationen im <i>MYBPC3</i> -Gen, deren Lokalisation und die daraus folgenden funktionalen Effekte	45
Tab. 13: Klinische Charakteristika des Indexpatienten (2), seiner Schwester (3), der gemeinsamen Mutter (4) und dem Sohn des Indexpatienten (5) mit dem Phänotyp einer HCM/HOCM und einer nachgewiesenen Mutation im <i>MYBPC3</i> -Gen	46
Tab. 14: Charakteristika der 23 Patienten für die <i>HDAC6</i> -Kandidatengenanalyse	61

8 DANKSAGUNG

Frau Prof. Dr. med. Marianne Dieterich und Frau Prof. Dr. med. Maggie C. Walter, M.A. möchte ich für die Möglichkeit zur Dissertation am Friedrich-Baur-Institut, für die hervorragenden Arbeitsbedingungen und das angenehme Arbeitsklima im Labor für Molekulare Myologie herzlich danken.

Besonderen Dank möchte ich meiner Doktormutter, Privatdozentin Dr. med. Dr. phil. Sabine Krause, für ihre umfassende Betreuung und ihre unschätzbare Hilfe beim Erstellen dieser Doktorarbeit aussprechen. Ihrer engagierten fachlichen und persönlichen Unterstützung konnte ich mir immer sicher sein, ohne die sich diese Arbeit nicht hätte realisieren lassen.

Mein großer Dank geht an das ganze Team des Labors für Molekulare Myologie, insbesondere an Marina Dusl und Tina Kubny, für ihre geduldige Einarbeitung in die einzelnen Methoden, die schnelle und unkomplizierte Hilfe bei Fragen und Problemen und nicht zuletzt für die herzliche Arbeitsatmosphäre. Vielen, vielen Dank!

Ich danke Frau Dr. med. Britt-Maria Beckmann aus der Spezialambulanz für Herzgenetik der Medizinischen Klinik und Poliklinik I des Klinikums Großhadern für die freundliche Überlassung ihrer Patientendaten inklusive noch nicht veröffentlichten Materials sowie Herrn Prof. Dr. med. Herbert Schreiber, Ulm, für die Zuweisung der Indexfamilie.

Meinem Freund Franz danke ich für die stetige sowohl fachliche als auch emotionale Unterstützung und für sein Interesse an meiner Arbeit. Auch meinem Freundeskreis gebührt Dank für jedes gutes Wort, für jede Aufmunterung und für die stetige Motivation.

Von ganzen Herzen bedanke ich mich bei meiner Familie, die mir mein Studium und damit auch das Erstellen dieser Doktorarbeit überhaupt erst ermöglicht hat, für ihre immerwährende Unterstützung, ihre ermutigenden Worte und dafür, dass es sie gibt!

9 EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG

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

„Identifizierung und Charakterisierung von neuen Kandidatengenenen bei
hereditären Skelettmuskelerkrankungen mit kardialer Beteiligung“

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

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

München, 04.08.2014

Madeleine Schuberth